

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

**Untersuchung der klinischen und röntgenologischen
Erfolgsrate sowie der antimikrobiellen Wirkung von
Ozongas bei apikaler Parodontitis im Vergleich zu einem
Standarddesinfektionsprotokoll – eine randomisierte,
kontrollierte, klinische Studie**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Stefan Michael Kist

aus
Bühl

Jahr
2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatte	Prof. Dr. med. dent. Karin Christine Huth
Mitberichterstatte	Prof. Dr. med. dent. Ekaterini Paschos
	Priv.-Doz. Dr. med. habil. Konrad Trölzsch
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	22.07.2016

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Apikale Parodontitis.....	6
1.1.1	Definition und Epidemiologie.....	6
1.1.2	Ätiologie	6
1.1.3	Pathomechanismus und Klassifikation	9
1.1.4	Symptome.....	12
1.1.5	Diagnose.....	12
1.1.6	Therapie und Prognose.....	13
1.2	Aktuelle Entwicklung in der Endodontie	15
1.3	Natriumhypochlorit	19
1.4	Ozon.....	22
1.4.1	Historie und Wirkmechanismus.....	22
1.4.2	Anwendung in der Zahnheilkunde.....	23
1.4.3	Ozongeneratoren	29
2	Fragestellung	32
3	Probanden und Methode.....	33
3.1	Studiendesign.....	33
3.2	Patientenkollektiv	33
3.3	Ort und Zeitraum der Studiendurchführung	33
3.4	Interventionen.....	34
3.4.1	Basisuntersuchung.....	34
3.4.2	Wurzelkanalbehandlung mit mikrobiologischer Probenentnahme.....	35
3.4.3	Nachuntersuchung	39
3.5	Mikrobiologische Probenaufbereitung	40
3.5.1	Bakterienkultur zur Quantifizierung der Keimlast	40
3.5.2	Bakterienidentifizierung.....	42
3.5.2.1	MALDI-TOF Massenspektroskopie.....	42
3.5.2.2	Extraktionsmethode	44
3.5.2.3	Sequenzierung	44
3.6	Datenanalyse	45
3.6.1	Ziele der Datenanalyse	45

3.6.2 Fallzahlberechnung.....	45
3.6.3 Randomisierung und Verblindung.....	46
3.6.4 Statistik	46
4 Ergebnisse	48
4.1 Klinische und röntgenologische Ergebnisse	48
4.2 Mikrobiologische Ergebnisse.....	50
4.3 Fallbeispiele	55
4.3.1 Fall 1	55
4.3.2 Fall 2	56
5 Diskussion	58
5.1 Klinische und röntgenologische Methoden und Ergebnisse	58
5.2 Mikrobiologische Methoden und Ergebnisse	60
5.3 Aussagekraft und Limitierung	62
6 Schlussfolgerung	64
7 Zusammenfassung.....	65
8 Literaturverzeichnis.....	67
9 Abbildungsverzeichnis	81
10 Tabellenverzeichnis.....	83
11 Abkürzungsverzeichnis	84
12 Anhang	86
12.1 Verwendete Geräte im Labor	86
12.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien und Chemikalien im Labor	86
12.3 Verwendete Geräte in der Patientenbehandlung.....	88
12.4 Verwendete Verbrauchsmaterialien und Chemikalien in der Patientenbehandlung	88
12.5 Zusammenfassung verwendeter Nährmedien und Lösungen	89
12.6 Votum Ethikkommission	92
12.7 Patienteninformation und Einwilligungserklärung	93
12.8 Untersuchungsbögen	95
13 Danksagung	101

14 Lebenslauf.....	102
---------------------------	------------

1 Einleitung

1.1 Apikale Parodontitis

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Das Krankheitsbild der apikalen Parodontitis ist definiert als eine Entzündung der periradikulären Gewebe.

In einer an der Berliner Bevölkerung durchgeführten epidemiologischen Studie mit 742 Patienten wiesen 57,8 % aller Patienten mindestens einen endodontisch behandelten Zahn auf (Viktorov, 2006). Aus einer Übersichtsarbeit von Hülsmann und Heppeler geht hervor, dass in Deutschland ca. 3-5 % aller Zähne von apikaler Parodontitis betroffen sind (Hülsmann und Heppeler, 2008). Der Anteil von wurzelkanalbehandelten Zähnen liegt in Deutschland ebenfalls bei ca. 3-5 %. Laut den Abrechnungszahlen der Kassenzahnärztlichen Bundesvereinigung wurden im Jahr 2013 in Deutschland 7,157 Millionen Wurzelkanäle abgefüllt.

Die Erfolgsquote für Zähne mit apikaler Parodontitis wird in einer Übersichtsarbeit zwischen 68-86 % angegeben (Trope und Debelian, 2009). In einer anderen Untersuchung wurde berichtet, dass bei optimaler endodontischer Therapie die 5-Jahres-Prognose für einen wegen apikaler Parodontitis wurzelkanalbehandelten Zahn durchschnittlich 82,7 % beträgt (Ricucci *et al.*, 2011). Die Größe der periapikalen Läsion wirkt sich auf die Erfolgsquote der Wurzelkanalbehandlung aus. Bei einer Läsion kleiner 5 mm beträgt sie noch 86,6 %, bei einer Läsion größer oder gleich 5 mm hingegen nur noch 79,4 %.

Diese Zahlen verdeutlichen welchen Stellenwert die endodontische Therapie in der zahnärztlichen Praxis einnimmt. Bei der Anzahl der Eingriffe wäre es für die moderne zahnerhaltende minimalinvasive Zahnmedizin wünschenswert in der Zukunft eine Erfolgsquote zu erhalten, die über den von Trope und Debelian beschriebenen 68-86 % liegt.

1.1.2 Ätiologie

Ursächlich für eine apikale Parodontitis ist die Infektion der Pulpa mit Mikroorganismen, welche sich nach apikal ausbreitet. Dies wurde durch eine vielfach zitierte Studie, in welcher die Pulpa von Ratten mit normaler Mundflora und von

keimfrei gehaltenen Ratten eröffnet und offen gelassen wurde belegt (Kakehasi *et al.*, 1965). Ähnliche Untersuchungsergebnisse lieferte zudem eine später durchgeführte Untersuchung an Affenzähnen (Möller *et al.*, 1981). Dabei wurden 78 Pulpen devitalisiert, 26 wurden steril belassen, 52 wurden mit Mundflora infiziert und alle anschließend für 6-7 Monate verschlossen. Bei den infizierten Zähnen entwickelte sich in 47 Fällen eine entzündungsbedingte radiologisch sichtbare Aufhellung. Bei den sterilen Zähnen konnte dies nicht beobachtet werden. Erste Hinweise darauf, dass Bakterien in Zusammenhang mit Erkrankungen der Pulpa stehen, lieferte bereits Miller 1894, der die Pulpa zerstörter Zähne mikroskopierte (Miller, 1894).

Die Ursachen für ein Eindringen von Bakterien in die Pulpa sind vielfältig. Karies ist eine der häufigsten Ursachen. Zunächst wird die Integrität des Schmelzes und später des Dentins verletzt. Dabei kann die Karies soweit fortschreiten, dass es zu einer direkten Eröffnung und somit zu einer Infektion der Pulpa kommt. Häufig ist die Pulpa bereits schon vorher infiziert, da Bakterien aufgrund ihrer geringen Größe in der Lage sind, die 1-2 µm großen Dentintubuli zu durchdringen (Reeves und Stanley, 1966). Solange die Dentinschicht, inklusive reizbedingt gebildetem Tertiärdentin, im Schnitt mehr als 1,11 mm beträgt, ist die Gefahr, dass sich eine Pulpitis entwickelt eher gering. Sinkt die Schichtstärke allerdings unter 0,5 mm, so nimmt die Wahrscheinlichkeit für eine Entzündung der Pulpa stark zu.

Für die Entstehung einer Pulpitis ist es nicht immer notwendig, dass die Bakterien selbst bis zur Pulpa vordringen (Bergenholtz, 1977; Pissiotis und Spångberg, 1994). Häufig reichen bereits Bakterientoxine wie Lipopolysaccharide, Lipoteichonsäure, etc. aus, um eine Entzündung auszulösen. Sie können über den Dentinliquor lange vor den Bakterien die Pulpa erreichen. Aufgrund der Fähigkeit von Bakterien in Dentintubuli einzudringen, kommen auch insuffiziente Restaurationen, welche über einen Randspalt Dentin exponieren oder Zahnhalsdefekte als Ursache in Betracht. Die ausgelöste Pulpitis kann, wenn sie länger besteht, in eine irreversible Pulpitis übergehen, was zur Pulpanekrose und schließlich zur apikalen Parodontitis führt.

Allerdings kann man immer wieder Zähne beobachten, die weder eine Karies, noch Restaurationen haben, aber eine apikale Parodontitis aufweisen (Love, 1996). Love untersuchte dieses Phänomen indem er mit einem Mikroleakage-Modell *in vitro* 20 Zähne für 7 Tage einer *Streptococcus gordonii* Suspension aussetzte. Dabei wurden

4 Zähne infiziert, 16 Zähne wiesen keine Bakterieninvasion auf. Diese 16 Zähne wurden durch einen kleinen Schlag, ohne dass es hierbei zu Frakturen kam, traumatisiert und anschließend erneut getestet. Von den 16 Zähnen wiesen im Versuchsaufbau nach einer Woche 7 Zähne eine Bakterieninvasion auf. Daraus lässt sich schließen, dass Schmelz- und Dentinfrakturen infolge eines Traumas, eine potentielle Eintrittspforte für eine Infektion der Pulpa darstellen.

Zahntraumata stellen eine weitere Ursache für eine apikale Parodontitis dar. Bei Zahntraumata mit Zahnhartsubstanzdefekten können abhängig vom Ausmaß der Frakturen Bakterien über freiliegende Dentinkanälchen (siehe oben) oder direkt durch Kontakt freiliegender Pulpen mit Speichel in den Zahn eindringen. Bei Traumata ohne Zahnhartsubstanzdefekte kann dies über die oben erwähnten Schmelz- und Dentinfrakturen stattfinden. Nagaoka und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Vitalität der Zähne für das Eindringen von Bakterien in die Tubuli eine wichtige Rolle spielt (Nagaoka *et al.*, 1995). Durch Analyse von Dentinliquor ist bekannt, dass dieser unter anderem Immunglobulin G, Fibrinogen und Albumin enthält und damit einen wichtigen Beitrag zum Schutz des Zahnes liefert (Knutsson *et al.*, 1994). Bei avitalen Zähnen wird aufgrund dieser fehlenden Abwehrfunktion ein Eindringen über Mikrorisse begünstigt.

Das Krankheitsbild der marginalen Parodontitis ist weit verbreitet und wird ebenfalls zu den Ursachen einer apikalen Parodontitis gezählt. In der Altersgruppe der 35- bis 44-Jährigen leiden 52,7 % aller Patienten unter einer mittelschweren und 20,5 % unter einer schweren Parodontitis (Micheelis und Schiffner, 2006). In der Gruppe der Senioren ist die Zahl der Patienten, die unter einer mittelschweren Parodontitis leiden, mit 48 % ähnlich hoch. Die Anzahl der Patienten, die von einer schweren Parodontitis betroffen sind, ist mit 39,8 % deutlich höher.

Bei der marginalen Parodontitis können Bakterien über kleine Seitenkanälchen oder bei fast vollständigem Knochenabbau auch direkt über das Foramen apikale das Wurzelkanalsystem infizieren (Siqueira, 2011a). Zur Pulpanekrose und Entwicklung einer apikalen Parodontitis kommt es einer Studie zufolge erst, wenn das Foramen apikale betroffen ist (Langeland *et al.*, 1974). Histopathologisch untersucht wurden 60 extrahierte Zähne mit marginaler Parodontitis unterschiedlicher Schwere. Die Infektion der kleinen lateralen Kanälchen des Wurzelkanalsystems verursacht zwar einen Pulpaschaden, aber keine Nekrose.

Iatrogen kann es im Rahmen einer Wurzelkanalbehandlung bei unsterilem Arbeiten zu einer Infektion des periapikalen Gewebes kommen. Beispielsweise können bei einer Devitalisierung aus prothetischen Gründen oder der Behandlung einer irreversiblen Pulpitis, bei welcher das apikale Gewebe noch nicht infiziert war, Speichelkeime eingeschleppt werden. Ebenso kann die iatrogen eröffnete vitale Pulpa bei einer Kariesexkavation mit Speichel kontaminiert werden.

1.1.3 Pathomechanismus und Klassifikation

Durch das Eindringen von Bakterien oder Bakterienprodukten kommt es zu einer Reaktion des Immunsystems (Behrends *et al.*, 2010; Siqueira 2011b). Wie bei jeder bakteriellen Infektion reagiert zuerst das unspezifische Immunsystem. Beteiligt an der unspezifischen zellulären Komponente sind Granulozyten, Monozyten bzw. Makrophagen, Mastzellen und natürliche Killerzellen. Sie werden unter anderem aktiviert durch bakterielle Bestandteile, wie z.B. Lipopolysaccharide oder Lipoteichonsäure, welche an, in der Membranoberfläche sitzende, Toll-like-Rezeptoren binden. Durch Phagozytose, die Freisetzung von vasoaktiven Substanzen und verschiedenen Zytokinen wirken sie den eindringenden Bakterien und deren Produkten entgegen. Das Freisetzen vasoaktiver Substanzen wie Prostaglandinen, Tromboxanen und Leukotrienen bewirkt am Ort des Geschehens durch Vasodilatation eine Verlangsamung des Blutflusses, um die Diapedese von weiteren Leukozyten mit anschließender Migration zum Entzündungsort zu ermöglichen. Weiter werden sogenannte Chemotaxine, wie z.B. Zytokine, Kinine und Leukotriene ausgeschüttet, welche insbesondere weitere neutrophile Granulozyten zum Entzündungsort lotsen.

Das Komplementsystem, Lysozym, Akut-Phase-Proteine und Zytokine sind Bestandteile des unspezifischen humoralen Immunsystems. Dessen Aufgaben sind die Lyse von Krankheitserregern durch Bildung eines Membranangriffskomplexes mit anschließender Porenbildung, die Opsonierung von körperfremden Stoffen sowie die Steigerung der Gefäßpermeabilität und Chemotaxis.

Besteht die Entzündung länger, so wird mit einer gewissen Verzögerung auch das spezifische Immunsystem aktiv. Dies besteht ebenfalls aus einer zellulären und einer humoralen Komponente. Hier sind besonders die T- und B-Lymphozyten zu nennen, welche Zytokine und Antikörper produzieren.

Das bei einer Entzündung ablaufende Geschehen erklärt auch, warum es bei einer länger andauernden Entzündung der Pulpa zur Pulpanekrose kommt. Durch die entzündungsbedingt freigesetzten vasodilatierenden Substanzen wird die Durchblutung im Zahn zunächst gesteigert (Siqueira, 2011c). Durch die erhöhte Gefäßpermeabilität kommt es zum Übertritt von Flüssigkeit aus den Gefäßen ins pulpace Bindegewebe. Der Druck im Zahn steigt an, wodurch es zur Kompression der den Zahn innervierenden Nervenfasern kommt. Dies und vor allem von den Entzündungszellen ausgeschüttete algogene Stoffe wie Prostaglandine, Kinine, Tachikinine, Purine, Serotonin, Histamin und freie Radikale sind der Grund für Schmerzen. Aufgrund der Tatsache, dass der Zahn dem entzündeten Gewebe wenig Spielraum lässt sich auszudehnen, kommt es infolge zunehmender Schwellung zu einer Kompression der den Zahn versorgenden Blutgefäße. Die für den Zahn drastische Folge ist die Pulpanekrose, häufig wird auch von einer Gangrän gesprochen.

In der infizierten Pulpa können sich Bakterien planktonisch oder in Form eines Biofilms zum apikalen Parodontium ausbreiten (Siqueira, 2011d). Die primär akute Form der apikalen Parodontitis geht meist mit der planktonischen Ausbreitung hoch virulenter Bakterien einher, während die chronische Form mit eher weniger virulenten, sich in Biofilmen organisierenden Bakterien einhergeht. Für *Staphylococcus aureus* wurde gezeigt, dass dieser zwischen planktonischer Form und Organisation in Biofilmen wechseln kann und sich hierbei sein Expressionsmuster deutlich unterscheidet (Resch *et al.*, 2005). Die Organisation in Biofilmen bietet den Bakterien einige Vorteile. Sie kommunizieren über Signalmoleküle miteinander und tauschen sich dadurch über Genexpression, Zellwachstum und das Nährstoffangebot aus (Siqueira, 2011d). Dieses Verhalten wird auch allgemein als Quorum sensing bezeichnet. Des Weiteren sind die Bakterien im Inneren eines Biofilmes gut gegen den Angriff des Immunsystems oder Medikamente geschützt.

Durch die sich nach periapikal ausbreitende Entzündung kommt es dort zur Knochenresorption. Ein komplexes System regelt das Verhältnis von Knochenauf- und ab- bzw. Umbau. Hier ist das „receptor activator of nuclear factor kappaB/receptor activator of nuclear factor kappaB ligand“ System (RANK/RANKL-System) als ein wichtiger Regelkreislauf des Knochenstoffwechsels zu nennen. Die

Osteoblasten steuern über die Sezernierung von RANKL und Osteoprotegerin den Knochenauf- sowie abbau.

Dieses System wird durch die Entzündung gestört. Im entzündlichen Gewebe vorhandene aktivierte T-Zellen können ebenfalls RANKL exprimieren (Kong *et al.*, 1999). RANKL bindet an RANK von monozytären Osteoklasten Vorläuferzellen und führt zu deren Differenzierung zu adulten Osteoklasten (Lacey *et al.*, 1998). Neuere Untersuchungen zeigen, dass bakterielle Lipoproteine indirekt über die Aktivität der Osteoblasten durch Hochregulierung der RANKL-Produktion und Herunterregulierung der Osteoprotegerin-Produktion Einfluss auf die Osteoklastendifferenzierung haben (Kim *et al.*, 2013). Durch bakterielle Produkte wie LPS werden Entzündungszellen wie Monozyten stimuliert. Diese exprimieren dann Entzündungsmediatoren wie beispielsweise IL 1, TNF, PGE1 und PGE2, welche die Osteoklasten stimulieren und zu Knochenresorptionen führen (Klein und Raisz 1970; Bertolini *et al.*, 1986; Nguyen *et al.*, 1991). Auch der saure pH-Wert im Bereich der Entzündung, ausgelöst durch saure Stoffwechselmetabolite wie Laktat, infolge von Minderversorgung, trägt zu einer Stimulation der Osteoklasten bei (Muzylak *et al.*, 2007). Osteoklasten produzieren vermehrt Cathepsin K und H⁺-ATPase. Diese setzen mit Hilfe von H⁺-ATPase und Chloridkanälen HCl frei, wodurch der Knochen demineralisiert wird. Die verbliebene organische Matrix wird durch kollagenspaltende lysosomale Proteasen, hauptsächlich Cathepsin K und Matrixmetalloproteinase-9 abgebaut. Im Zuge dieser Entzündung kann es auch zu einer Gewebeschmelzung und somit zu einem odontogenen Abszess kommen oder durch Aktivierung von Malessez'schen Epithelresten zur Bildung einer radikulären Zyste (Browne 1975).

Fabricius und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Ausprägung, bzw. die Entwicklung und der Verlauf einer apikalen Parodontitis auch von den eindringenden Bakterienspezies abhängig sind (Fabricius *et al.*, 1982). Sie zeigten in einem Tierversuch mit Affen, dass Mischinfektionen größere apikale Aufhellungen im Röntgenbild verursachen als Monoinfektionen. Auch konnte er zeigen, dass die an der Infektion beteiligten Keimarten einen unterschiedlichen Einfluss auf die Reaktion des periapikalen Gewebes haben. So induzieren fakultativ anaerobe Streptokokken nur eine schwache apikale Reaktion.

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO 1995) hat die Erkrankungen des periapikalen Gewebes in fünf Kategorien eingeteilt. Unterschieden werden folgende Formen (ICD-10-GM Version 2013):

K04.4 Akute apikale Parodontitis ausgehend von der Pulpa

K04.5 Chronische apikale Parodontitis ausgehend von der Pulpa

K04.6 Periapikaler Abszess mit Fistel

K04.7 Periapikaler Abszess ohne Fistel

K04.8 Radikuläre Zyste

1.1.4 Symptome

Die Symptomatik einer apikalen Parodontitis kann sehr unterschiedlich sein (Wolf 2007; Klimm, 2011; Siqueira 2011c). Charakteristisch bei einem akuten Verlauf ist das Vorhandensein eines stumpfen, pochenden Schmerzes, eine Aufbissemphindlichkeit des erkrankten Zahnes, periapikaler Druckschmerz, Schwellung bis hin zur Exazerbation in Form eines Abszesses mit begleitenden Allgemeinsymptomen wie Fieber, Linksverschiebung der Leukozyten im Blutbild, Anstieg von Akut-Phase-Proteinen, Schluckbeschwerden und Atemnot. Typische klinische Befunde sind negative Sensibilität und positive Perkussion. Liegt eine Drainage in Form einer Fistel vor, können die Symptome verringert sein oder ganz fehlen. Die chronische apikale Parodontitis wird häufig als Zufallsbefund anhand einer Röntgenübersichtsaufnahme diagnostiziert. Gerät das Verhältnis zwischen der chronischen Entzündung und der Immunabwehr aus dem Gleichgewicht, so kann diese auch einen sekundär akuten Verlauf mit den oben beschriebenen Symptomen nehmen.

1.1.5 Diagnose

Um eine apikale Parodontitis (Wolf 2007; Klimm, 2011; Siqueira 2011c) sicher zu diagnostizieren, sind einige Untersuchungen des Zahnes notwendig. Begonnen werden muss, wie bei jeder anderen Erkrankung, mit der Anamnese. Über die Anamnese allein können schon viele wichtige Hinweise gewonnen werden. Bei der Frage nach den Schmerzen sind Angaben wie Spontanschmerz, pochend, ziehende Schmerzen ein wichtiger Hinweis auf das mögliche Vorliegen einer apikalen Parodontitis.

Die Inspektion und Palpation können weitere Hinweise liefern. Oft findet man insuffiziente Restaurationen, Karies, Parodontitis, Schwellungen, Fisteln oder eine apikale Druckdolenz. Um die anfängliche Verdachtsdiagnose zu erhärten, werden standardmäßig ein Perkussionstest und ein Sensibilitätstest (heiß, kalt, elektrisch) durchgeführt. In einer Studie wurde deren Spezifität und Sensitivität untersucht mit dem Ergebnis, dass die Treffsicherheit solcher Tests kritisch zu sehen ist, da sowohl falsch positive als auch falsch negative Ergebnisse entstehen können (Hyman und Cohen, 1984). Es wird empfohlen sich am Ende aus allen verfügbaren diagnostischen Informationen ein Bild zu machen. Eine Wurzelkanalbehandlung ist eine irreversible Behandlung, deshalb ist eine sichere Diagnose unumgänglich.

Nach der klinischen Untersuchung folgt die radiologische Untersuchung des Zahnes. Von dem betroffenen Zahn wird ein apikaler Einzelzahnfilm angefertigt. Allerdings lässt sich eine periapikale Aufhellung im Röntgenbild erst mit einer gewissen Verzögerung diagnostizieren (Jorge *et al.*, 2008). In einer Studie fand man heraus, dass nach 7 Tagen post infectionem radiologisch noch keine Veränderung im Röntgenbild zu erkennen ist. Nach 15 Tagen findet man zu 47,4 %, nach 30 Tagen zu 77,8 % und nach 60 Tagen zu 100 % eine Aufhellung im Röntgenbild.

1.1.6 Therapie und Prognose

Bei einem Zahn mit apikaler Parodontitis, der ansonsten erhaltungswürdig erscheint, ist die Therapie der Wahl eine Wurzelkanalbehandlung. Liefert diese nicht den gewünschten Erfolg, dann kann zunächst eine Revision versucht werden. Weiter besteht die Möglichkeit einer Wurzelspitzenresektion. Liefert dies alles keinen Erfolg, dann bleibt nur noch die Extraktion.

Zu dem standardisierten Vorgehen einer Wurzelkanalbehandlung gehören die mechanische Aufbereitung in Verbindung mit antimikrobiellen Spüllösungen, ggf. eine Medikamenteneinlage und die abschließende Wurzelfüllung.

Allein die mechanische Aufbereitung, auch ohne Verwendung einer desinfizierenden Lösung, reduziert die Bakterienlast enorm, besonders mit zunehmender Feilengröße im apikalen Drittel (Bystrom und Sundqvist, 1981; Dalton *et al.*, 1998; Siqueira *et al.*, 1999; Shuping *et al.*, 2000). Weitere Studien belegen, dass durch die zusätzliche Verwendung antimikrobieller Spüllösungen die Effektivität der mechanischen Aufbereitung gesteigert wird (Shuping *et al.*, 2000; Kvist *et al.*, 2004). Für gewöhnlich

wird Natriumhypochlorit (NaOCl) in Konzentrationen zwischen 0,5 und 6 % verwendet, wobei mit steigenden Konzentrationen die Wirkung nur unwesentlich zunimmt (Trope und Debelian, 2009). Trope und Debelian berichten, dass es nicht möglich ist, vorhersagbare bakterienfreie Wurzelkanäle durch mechanische Aufbereitung in Verbindung mit NaOCl-Spülungen unterschiedlicher Stärke zu erreichen. Hierbei beziehen sie sich auf eine Studie von McGurkin-Smith und Mitarbeiter, in welcher alle 5 min NaOCl und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) über einen Zeitraum von 30 min erneuert wurden (McGurkin-Smith 2005).

Die Entfernung der durch die mechanische Aufbereitung entstandenen Schmierschicht, welche die Dentintubuli verschließt, ist wichtig zur Verbesserung der Desinfektionswirkung (Ørstavik und Haapasalo, 1990). Dies wird üblicherweise mit EDTA, einem Chelatbildner, erreicht. Durch die chelatbildenden Eigenschaften bildet es auch Komplexe mit Kalziumionen und weicht so die Dentinoberfläche bis zu einer Tiefe von 20-50 µm etwas auf und erleichtert die Entfernung entstandener Dentinspäne (Di Lenarda *et al.*, 2000). Ähnliche Effekte können auch mit Zitronensäure erzielt werden. Deren beider Wirkung kann durch Ultraschallaktivierung noch gesteigert werden (Herrera *et al.*, 2013). In Verbindung mit NaOCl, als antimikrobielle Spüllösung, wird Chlorhexidindigluconat (CHX) unter Zwischenspülung von NaCl als Abschlussspülung empfohlen (Safavi und Spångberg, 2006).

Wurzelkanalbehandlungen können in einer einzigen Sitzung oder über mehrere Behandlungssitzungen hinweg durchzuführen werden, es gibt hierfür unterschiedliche Therapieprotokolle. Bei den zweizeitigen Protokollen wird häufig Calciumhydroxid (Ca(OH)_2) als Medikament für ein bis zwei Wochen in den Wurzelkanal eingebracht (Trope und Debelian, 1999; Weiger *et al.*, 2000; Dorasani *et al.*, 2013). In einer Arbeit von Weiger und Mitarbeiter wurde untersucht, ob das unterschiedliche Vorgehen Einfluss auf das Behandlungsergebnis hat. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Weiger *et al.*, 2000). In zwei anderen Untersuchungen konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, da hierfür die Patientengruppen zu klein waren (Trope *et al.*, 1999; Dorasani *et al.*, 2013). Allerdings scheint bei apikaler Parodontitis das zweizeitige Vorgehen, mit einwöchiger Ca(OH)_2 -Einlage, einen geringen Vorteil gegenüber dem einzeitigen

Vorgehen zu haben. Die antimikrobielle Wirkung von Ca(OH)_2 resultiert aus der alkalischen Wirkung der freigesetzten Hydroxidionen (pH 12,5-12,8).

Die Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK) beschreibt in ihrer aktuellen Stellungnahme die seit Jahrzehnten bewährte Wurzelkanalfüllung durch laterale Kompaktion unter Verwendung von Sealer und Guttapercha als den Standard (Hülsmann und Schäfer, 2007). Eine Nachuntersuchung von Wurzelkanalbehandlungen wird nach sechs Monaten, zwölf Monaten, zwei und vier Jahren empfohlen.

Die Prognose für Zähne mit apikaler Parodontitis wird in einer Übersichtsarbeit mit 68-86 % angegeben (Trope und Debelian, 2009). Hierbei wird für eine günstige Prognose die Entfernung möglichst vieler Bakterien aus dem infizierten Wurzelkanalsystem als besonders wichtig angesehen (Sjögren *et al.*, 1997). Bei Sjögren und Mitarbeiter war die Prognose von Zähnen, die vor der definitiven Wurzelfüllung noch einen positiven mikrobiologischen Befund aufwiesen, 26 % schlechter im Vergleich zu Fällen, in denen keine Bakterien mehr nachweisbar waren (94%). In einem Tierversuch fand man eine Misserfolgsquote von 79% wenn zum Zeitpunkt der Wurzelfüllung noch Bakterien nachweisbar waren, ohne lag die nur bei 28% (Fabricius *et al.*, 2006). Weiter wird berichtet, dass der röntgenologische Heilungsprozess signifikant schneller verläuft, wenn zum Zeitpunkt der Wurzelfüllung keine Bakterien im Kanal mehr nachweisbar waren (Waltimo *et al.*, 2005). Es gibt aber auch Studien, welche keinen Zusammenhang zwischen röntgenologischer Heilung und dem Nachweis von Bakterien im Wurzelkanal finden konnten (Peter und Wesselink, 2002). Dennoch wird die komplette Elimination von Mikroorganismen, mehrheitlich, als entscheidender Beitrag für beste klinische und röntgenologische Ergebnisse favorisiert. Neben der Entfernung möglichst vieler Bakterien aus dem Wurzelkanalsystem ist die Verhinderung einer Reinfektion ebenso entscheidend. Hierzu tragen eine dichte Wurzelkanalfüllung und eine dichte restaurative Versorgung bei, wobei die Dichtigkeit der Restauration in Diskussion steht, einen größeren Anteil am Erfolg einer Wurzelkanalbehandlung zu haben (Sritharan, 2002).

1.2 Aktuelle Entwicklungen in der Endodontie

Seitdem man Wurzelkanalbehandlungen durchführt, wird permanent an der Verbesserung der Feilensysteme zur schnelleren und effizienteren Aufbereitung

sowie an der möglichst effektiven Entfernung von Mikroorganismen aus dem Wurzelkanalsystem geforscht. In den letzten Jahren hat sich viel getan. Die maschinelle Aufbereitung des Wurzelkanalsystems gilt heute als Standard in der Endodontie. Die derzeitige Entwicklung geht in die Richtung von Ein-Feilensystemen wie dem WaveOne (DENTSPLY DeTray, Konstanz, Deutschland), Reziproc (VDW GmbH, München, Deutschland) oder dem SAF System (ReDent Nova Ltd., Ra'anana, Israel). Das SAF-System erlaubt sogar eine gleichzeitige chemomechanische Aufbereitung. Diese Feile muss man sich als ein flexibles Drahtgerüst vorstellen, durch das bei der Aufbereitung gleichzeitig NaOCl gespült wird. Eine aktuelle Studie hierzu bestätigt eine bessere Bakterienreduktion und eine bessere Bearbeitung der Kanaloberfläche im Vergleich zu einem herkömmlichen Nickel-Titan-Feilensystem (BioRace -System, FKG Dentaire SA, La Chaux-de-Fonds, Schweiz) (Siqueira *et al.*, 2010). Nach chemomechanischer Aufbereitung waren beim BioRace System in 55 % der Fälle und beim SAF Systems in nur 20 % der Fälle noch Bakterien nachweisbar.

Die Forschung im Bereich Desinfektion des Wurzelkanalsystems beschäftigt sich in den letzten Jahren immer wieder mit Alternativen zu NaOCl wie beispielsweise dem Einsatz von Laser oder Photodynamischer Therapie (PDT). Auch an der Verbesserung der NaOCl-Wirkung durch Erwärmen von NaOCl und Ultraschallaktivierung wurde gearbeitet. In einer Übersichtsarbeit stellten van der Sluis und Mitarbeiter dar, dass es durch den Einsatz von „Passive Ultrasonic Irrigation“ (PUI) zu einer vermehrten Entfernung von Smear layer und Bakterien kommt (van der Sluis *et al.*, 2007). Sirtes und Mitarbeiter konnten im *in vitro* Versuch zeigen, dass sich die gewebsauflösende und desinfizierende Wirkung durch Erwärmen von NaOCl signifikant steigern lässt (Sirtes *et al.*, 2005).

Auch die Techniken der Kanalobturation haben sich in den letzten Jahren vervielfältigt. Die Laterale Kompaktion ist unter den aktuell verwendeten Füllmethoden mit Abstand die Älteste. Sie stellt nach wie vor das weltweit meist verbreitetste Verfahren dar, welches sich durch einfache Handhabung und der Zuverlässigkeit, Wurzelkanäle bakteriendicht zu verschließen, bewährt hat. Die als Schilder-Technik bekannte vertikale Kompaktion kam 1967 dazu (Schilder, 1967). Anfang der 1990er Jahre kam Thermafil als ein trägerbasiertes Guttaperchasystem hinzu (DENTSPLY DeTray, Konstanz, Deutschland). Die neueste Entwicklung in der

thermoplastischen Wurzelkanalfüllung ist die kunststoffträgerfreie Guttapercha, GuttaFusion (VDW GmbH). Dies ermöglicht dem Zahnarzt schnelle Wurzelfüllungen nach dem Thermafil-System durchzuführen, welche bei Bedarf wieder leicht zu revidieren sind, wie es bei der Schilder-Technik oder der lateralen Kompaktion der Fall ist. Mit dem seit 2003 dem Markt befindlichen Resilon/Epiphany-System (Pentron Corp., Wallingford, CT, USA) gibt es nun auch die Möglichkeit der adhäsiven Wurzelfüllungen.

In einer Untersuchung zur Dichtigkeit von Wurzelfüllungen wurden sechs unterschiedliche, sich auf dem Markt befindliche, Wurzelfüllsysteme miteinander verglichen. (Gençoglu *et al.*, 2007). Gegenstand der Untersuchung waren drei trägerbasierte Guttaperchasysteme (ThermaFil, JS Quick-Fil, Soft-Core), ein System mit modifizierten Schilder-Technik (System B), ein System mit warmer lateraler Kompaktion (MicroSeal) sowie die klassische kalte laterale Kompaktion. Die Wurzelfüllungen an extrahierten Zähnen wurden für zwei Jahre in eine feuchte Kammer mit 100 % Luftfeuchtigkeit und 37 °C gegeben. Anschließend wurde die Dichtigkeit mit Hilfe eines computergestützten Flüssigkeitsfiltrationsmessgeräts mit Laser gemessen. Dabei schnitten das MicroSeal-System und die kalte laterale Kompaktion signifikant schlechter ab im Vergleich zu den anderen Systemen. Im Vergleich der anderen Systeme untereinander ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Bei Sealern gelten derzeit epoxidharzbasierte Sealer als Goldstandard. In drei unabhängigen Studien wurde die Überlegenheit der Kombination AH Plus/Guttapercha zu Resilon/Epiphany belegt (Paqué und Sirtes, 2007; Santos *et al.*, 2010; Patil *et al.*, 2013). Bei Patil und Mitarbeiter wurde zusätzlich noch ein weiteres adhäsives Wurzelfüllsystem (EndoREZ) verglichen, was dort in Bezug auf die Klebeverbundfestigkeit nur Werte von durchschnittlich 0,56 MPa im Vergleich zum Testsieger AH Plus mit 1,49 MPa erreichte (Patil *et al.*, 2013).

Ein in den letzten Jahren immer mehr in Mode gekommenes Forschungsgebiet beschäftigt sich mit der Regeneration des Wurzelkanalsystems. Es gibt zahlreiche Arbeiten, die sich mit dem Thema Revaskularisierung und mit pulpalen Stammzellen beschäftigen. Von der American Association of Endodontics (American Association of Endodontics, 2015) gibt es ein Protokoll zur Durchführung einer Revaskularisierung bei Zähnen mit nicht abgeschlossenem Wurzelwachstum. Dabei

wird nach vorsichtiger Reinigung der Kanäle für 3-4 Wochen ein Ca(OH)_2 - Präparat oder alternativ ein 3-fach Antibiotikamix aus Metronidazol, Minocyclin und Ciprofloxacin in die Kanäle gegeben. In der zweiten Sitzung wird dies bei Beschwerdefreiheit wieder entfernt und überinstrumentiert, damit es zu einer Einblutung kommt. Die Bildung eines Blutkoagels wird abgewartet und wenn nötig mit Hilfe eines Kollagenvlieses stabilisiert. Es folgt eine Überkappung mit weißem Mineral Trioxid Aggregat oder Ca(OH)_2 . Darüber wird eine 3-4 mm dicke Schicht Glasionomerzement platziert (American Association of Endodontics, 2015). Der Rest der Kavität kann mit Komposit verschlossen werden.

Die Regeneration der Pulpa durch Einbringen von pulpalen Stammzellen ist derzeit allerdings nur eine Vision. Derzeit wird noch Grundlagenforschung hierzu betrieben. Für die Implantation pulpaler Stammzellen in das leere Wurzelkanalsystem sind geeignete Träger notwendig. An diese werden hohe Anforderungen gestellt. Sie sollen als Leitschiene dienen, für das Wachstum und die Differenzierung ein geeignetes Milieu bieten und resorbierbar sein. Zahlreiche Arbeiten beschäftigen sich mit der Suche nach geeigneten Scaffolds für das Einbringen pulpaler Stammzellen (Yang *et al.*, 2010; Galler *et al.*, 2011a; Sakai *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Cavalcanti *et al.*, 2013). In einem Tierversuch an immunsupprimierten Mäusen wurde auch untersucht, wie sich die Vorbehandlung des Dentins mit NaOCl oder EDTA auf die Anlagerung pulpaler Stammzellen und damit der Pulparegeneration auswirkt, wobei EDTA dabei deutlich besser abschnitt (Galler *et al.*, 2011b). Andere Arbeiten beschäftigen sich mit der Wirkung von Wachstumsfaktoren auf pulpalen Stammzellen und deren Differenzierung. Mathieu und Mitarbeiter untersuchten die Wirkung von „transforming growth factor beta 1“ (TGF- β 1) und „fibroblast growth factor 2“ (FGF-2) auf die Stammzellen (Mathieu *et al.*, 2013). Dabei zeigte FGF-2 eine proliferative und TGF- β 1 chemotaktische Wirkung auf die Zellen. Die Forschergruppe um Seo konnte zeigen, dass eine Exposition pulpaler Stammzellen mit Mineralischem Trioxid-Aggregat (MTA) zu einer odontogenen Differenzierung führt (Seo *et al.*, 2013). Fluorchinolon-Acetonid fördert die Proliferation und regt die Mineralisation pulpaler Stammzellen an (Liu *et al.*, 2013).

1.3 Natriumhypochlorit

NaOCl in den für gewöhnlich verwendeten Konzentrationen von 0,5 % bis 6 % liegt in wässriger Lösung vor. Dabei dissoziiert NaOCl zu Natriumhydroxid und Hypochlorige Säure. Es bildet sich ein chemisches Gleichgewicht (Estrela *et al.*, 2002):



In der Literatur werden drei chemische Reaktionen beschrieben, die den Wirkmechanismus von NaOCl näher erläutern. Sowohl das Natriumhydroxid als auch die Hypochlorige Säure sind sehr reaktive Verbindungen und gehen chemische Reaktionen mit verschiedenen Molekülen von Bakterien und Geweben ein. Zwischen Triglyceriden und dem Natriumhydroxid findet eine Verseifungsreaktion statt, bei der Tenside und Glycerin entstehen. Die entstandenen Tenside setzen die Oberflächenspannung der Spülflüssigkeit herab, was deren Wirkung durch tieferes Eindringen in Dentinkanälchen und akzessorische Seitenkanälchen verbessert. Mit Aminosäuren geht Natriumhydroxid eine Neutralisationsreaktion ein. Hierbei entsteht das Salz der Aminosäure und Wasser. Weiter wird eine Reaktion zwischen der hypochlorigen Säure und Aminosäuren beschrieben. Als Reaktionsprodukte entstehen Chloramine und Wasser. Durch die Fähigkeit Reaktionen mit Aminosäuren und Fettsäuren einzugehen, erklärt sich die desinfizierende und gewebeauflösende Wirkung.

Um eine ausreichende Desinfektion zu erreichen, wurden zahlreiche Studien zur Ermittlung der benötigten Kontaktzeit in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration durchgeführt (Gomes *et al.*, 2001; Spratt *et al.*, 2001; Clegg *et al.*, 2006; Retamazo *et al.*, 2010). Clegg und Mitarbeiter untersuchten an extrahierten autoklavierten Zähnen, nach Infektion mit Speichel des Patienten und Biofilmbildung unter anaeroben Bedingungen die Effektivität von NaOCl verschiedener Konzentrationen (Clegg *et al.*, 2006). Sie berichteten, dass sich nach 15 min Kontakt mit einer 3-prozentigen NaOCl Lösung der Biofilm aufgelöst hatte, aber noch 20 % der Keime kultivierbar waren. Bei Verwendung einer 6-prozentigen NaOCl Lösung waren nach 15 min keine Keime mehr kultivierbar. In einer anderen Untersuchung wurde die Effektivität verschiedener Desinfektionsmittel, darunter 2,25 % NaOCl, nach 15 min und nach 60 min auf *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus intermedius*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* und *Parvimonas micros*

Monospeziesbiofilme untersucht (Spratt *et al.*, 2001). Dabei wurde nur bei *S. intermedius* und *F. nucleatum* Biofilme nach 15 min keine vollständige Desinfektion erreicht. Die *in vitro* Ergebnisse solcher Studien können allerdings nicht einfach auf den lebenden Organismus übertragen werden. Die Forschergruppe um Pappen fand heraus, dass Serumalbumin die Wirkung von NaOCl inhibieren kann (Pappen *et al.*, 2010).

Die gewebeauflösende Wirkung ist neben der desinfizierenden Wirkung mit einer der wichtigsten Gründe für den Einsatz von NaOCl in der Endodontie. Im Vergleich zu anderen Spüllösungen wie CHX, Zitronensäure oder Wasserstoffperoxid zeigt NaOCl das höchste gewebeauflösende Potential (Naemmi *et al.*, 2004).

Man weiß seit langem, dass die Anatomie des Wurzelkanalsystems jedes einzelnen Zahnes sehr individuell ist. In einer Studie wurde die Effektivität verschiedener Aufbereitungssysteme untersucht mit dem Ergebnis, dass unabhängig von den dort verwendeten Feilensystemen ca. 35 % der Kanaloberfläche unbearbeitet blieben (Peters *et al.*, 2001). Nekrotische Gewebereste sind eine potentielle Nährstoffquelle für im Wurzelkanal verbliebene Bakterien.

Die Fähigkeit Gewebe aufzulösen bringt aber auch gravierende Nachteile mit sich, wie eine nicht zu unterschätzende Zytotoxizität. In einer Studie wurde durch 30-minütige Exposition die hämolysierende Wirkung von 5,25-prozentiger NaOCl-Lösung, verschiedener Verdünnungsstufen, auf Erythrozyten getestet (Pashley *et al.*, 1985). Bei 1000-facher Verdünnung kam es zu einer Hämolyserate von 96,3 %. Weiter wurde im Tierversuch der Effekt von NaOCl auf Hasenaugen getestet. Es kam zu einem Ödem und Hyperämie der Lider und der Konjunktiven sowie zu einer leichten Schädigung der Kornea aber ohne Dickenveränderung oder Ulzerationen. Im Experiment besserten sich die Symptome nach 48 und 72 Stunden, waren aber auch nach 7 Tagen noch nicht völlig verschwunden. Letzter Bestandteil dieser Studie war die intradermale Injektion von NaOCl in verschiedenen Konzentrationen. Hierbei zeigten sich innerhalb von 24 Stunden Ulzerationen der Haut. Dass diese Experimente einen wichtigen Bezug zum Praxisalltag aufweisen zeigen immer wieder Fallberichte. Berichtet wurde mehrfach von NaOCl, welches bei der Wurzelkanalspülung, durch während der Aufbereitung entstandenen Perforationen, ins periradikuläre Gewebe gelangt war oder während der Spülung über das Foramen apikale hinaus gepresst wurde. Weiter wird berichtet über unglücklicherweise NaOCl

Spritzer, welche in das Auge des Patienten oder des Behandlers gelangte sind (Goswami *et al.*, 2014, Gernhardt *et al.*, 2004; Paschoalino *et al.*, 2012; Hülsmann und Hahn, 2000; Ingram, 1990)

Die Studienlage zum Haftverbund von Glasfaserstiften nach Verwendung von NaOCl als Desinfektionsmittel ist gering. In einer Studie wurde der Klebeverbund von einem selbstätzenden Adhäsivsystem (Multicore/AdheSE DC), einem Etch und Rinse System (CoreXFlow/XP Bond) und einem selbstadhäsiven Zement (SmartCem) getestet (Bitter *et al.*, 2013). Die Verwendung von 5,25 % NaOCl mit 18 % EDTA erhöhte den Haftverbund des selbstadhäsiven Zementes während die Verwendung von 1 % NaOCl und PUI den Verbund von Multicore/AdheSE DC und CoreXFlow/XP Bond erhöhten. Es wird verlangt das Spülprotokoll auf das Befestigungssystem von Stiften abzustimmen. In einer anderen Studie wurde der Klebeverbund zwischen C&B Metabond, Panavia F, Variolink II, RelyX Unicem und dem Wurzelkanalentin untersucht (Ari *et al.*, 2003). Dabei wurde bei allen, außer RelyX der Haftverbund durch NaOCl negativ beeinflusst. Dennoch war er im Vergleich zu den anderen in dieser Studie sowie im Vergleich zu den bei Bitter und Mitarbeiter untersuchten Materialien für C&B Metabond mit 27,7 MPa ($\pm 5,9$ MPa) vor NaOCl Behandlung und 22,6 MPa ($\pm 3,9$ MPa) nach NaOCl Behandlung am höchsten.

Bezüglich des Haftverbundes von Dentinadhäsiven zu Dentin, nach Verwendung von NaOCl, wurden in einer Studie vier verschiedene Adhäsivsysteme (ClearfilSE Bond, Prompt L-Pop, Scotchbond MultiPurpose Plus, Prime & Bond NT) getestet (Ozturk und Özer, 2004). Bei allen getesteten Adhäsiven war eine deutliche Abnahme des Haftverbundes zu verzeichnen. Im besten Fall lag die Minderung des Klebeverbundes bei 14 % für Prompt L-Pop und im schlechtesten Fall bei 52 % für Scotchbond MultiPurpose Plus. Im Vergleich dieser vier Adhäsivsysteme erzielte Clearfil SE Bond mit 20,87 MPa vor und 15,58 MPa nach NaOCl Desinfektion die besten Werte. Neben der Abnahme des Haftverbundes von Dentin und Dentinadhäsiven wird durch die Verwendung von NaOCl auch die Mikrohärtigkeit von Dentin selbst signifikant verschlechtert (Fuentes *et al.*, 2004).

1.4 Ozon

1.4.1 Historie und Wirkmechanismus

Eine Alternative zu NaOCl stellt der Einsatz von gasförmigem Ozon dar. Ozon ist seit langem für seine antimikrobielle Wirkung bekannt. Bereits 1893 veröffentlichte Wilhelm Ohlmüller ein Buch „über die Einwirkung von Ozon auf Bakterien“ (Ohlmüller, 1893). Im selben Jahr ging die erste Ozonanlage zur Trinkwasserdesinfektion in Oudshoorn, in den Niederlanden in Betrieb. Auch die Anwendung in Medizin und Zahnmedizin ist nichts Neues. Während des ersten Weltkrieges wurde durch den deutschen Militärarzt Wolff Ozon in der Behandlung infizierter Wunden eingesetzt (Schmidt, 1988). Als einer der Pioniere beim Einsatz von Ozon in der Zahnmedizin gilt der Züricher Zahnarzt Dr. Fisch. Er entwickelte in seinem Labor den Ozongenerator Cytozon, mit dem er dann später auch Patienten behandelte. Er desinfizierte damit die Wurzelkanäle nekrotischer Zähne (Fisch 1936a; Fisch 1936b).

Ozon ist eine chemisch instabile Verbindung dreier Sauerstoffatome mit einer Halbwertszeit von 40 min bei 20 °C (Lynch, 2004). Bei dessen Zerfall entstehen ein zweiatomiges Sauerstoffmolekül und ein hochreaktives Sauerstoffradikal. Das freie Sauerstoffradikal kann eine Vielzahl von organischen Verbindungen oxidieren. Es gibt zwei Studien aus den USA, die sehr anschaulich die Wirkung von Ozon auf Bakterien beschreiben. In einer Studie wurde im Zeitverlauf die Wirkung von Ozonwasser (600 ppm/min Flussrate) und in der anderen die Wirkung von Ozongas (600 ppm) auf *Escherichia coli* untersucht (Komanapalli 1996, 1997). Nachgewiesen wurde eine Lipidperoxidation, Proteinoxidation und Schädigung der DNA. Durch die Oxidation von Membranlipiden kommt es zu einer Störung der Zellwandpermeabilität mit anschließender Bakterienlyse. Es können Proteine und DNA aus dem Zytoplasma austreten. Für einzelne Enzyme wurde in Zeitversuchen eine Abnahme der Enzymaktivität aufgrund der Proteinoxidation beobachtet. Durch Extraktion von Plasmid-DNA, mit sowie ohne anschließendem Restriktionsverdau und Gelelektrophorese, ließ sich abhängig von der Expositionszeit eine zunehmende Schwächung der vorhandenen Banden beobachten, was für eine zunehmende Schädigung der DNA spricht. Bakterien besitzen wie Zellen auch Mechanismen, um mit der Toxizität freier Radikale umgehen zu können (Patil *et al.*, 2011). Durch Forschung mit *E. coli*-Mutanten wird sogar vermutet, dass der primäre Angriffspunkt

von Ozon die DNA ist. Erst wenn durch DNA-Schäden die Mechanismen freie Radikale zu bewältigen versagen, kommt es zur Zellyse.

Ein Nachteil von Ozon, ebenso wie bei NaOCl ist, dass auch Ozon nicht nur auf Bakterien, sondern auch auf Zellen toxisch wirkt (Huth *et al.*, 2006). Eine *in vitro* Untersuchung hat Ozongas und ozoniertes Wasser mit anderen in der Endodontie eingesetzten Spüllösungen verglichen. Dabei war Ozongas im WST-1 Test ähnlich toxisch wie NaOCl und Wasserstoffperoxid. Ozoniertes Wasser war auch bei hohen Konzentrationen (20 g/m^3) nur geringfügig toxisch. Im Vergleich zu NaOCl ist Ozongas alleine nicht gewebeauflösend, kann aber in Kombination mit NaOCl dessen gewebeauflösende Wirkung steigern (Rossi-Fedele *et al.*, 2013).

Ozon kommt auch in unserer Umwelt vor. Gerade im Sommer bildet sich dieses vermehrt unter dem Einfluss von UV-Strahlung und der Reaktion von Stickoxiden mit Sauerstoff. Aufgrund der gesundheitsgefährdeten Eigenschaften hat das Umweltbundesamt zum Schutz der menschlichen Gesundheit Grenzwerte für bodennahes Ozon festgelegt (Umweltbundesamt, 2015). Ziel ist eine Ozonkonzentration von weniger als 120 µg/m^3 . Gemittelt über drei Jahre darf die Ozonkonzentration die 120 µg/m^3 an maximal 25 Tagen im Jahr überschreiten. Bei Ozonkonzentrationen größer 180 µg/m^3 wird die Bevölkerung informiert, bei Konzentrationen größer 240 µg/m^3 alarmiert. Hohe Ozonkonzentrationen führen zu Reizungen der Atemwege, Husten, Kopfschmerzen und Atembeschwerden bis hin zu Einschränkungen der Lungenfunktion und Lungenerkrankungen.

1.4.2 Anwendungsgebiete in der Zahnmedizin

Die Anwendung von Ozongas und Ozonwasser ist inzwischen in alle Teilgebiete der Zahnmedizin und der zahnmedizinischen Forschung vorgedrungen.

Sicherlich am besten untersucht ist hierbei die Anwendung in der Kariestherapie. Auf die Behandlung initialer Fissurenkaries zeigte Ozongas einen positiven Effekt (Atabek und Oztas, 2011). In einer *in vivo* Untersuchung mit 40 Kindern kam es zu einer mit DiagnoDent messbaren Verbesserung von initialer Fissurenkaries durch Remineralisation nach Ozongasbehandlung. Bei Kindern, welche an den ersten bleibenden Molaren auf beiden Seiten Fissurenkaries aufwiesen, wurde ein Molar davon mit Ozongas (4 g/m^3 , 40 s) oder mit Ozongas und einer Remineralisationslösung behandelt, der andere blieb unbehandelt. Es zeigten sich

signifikante Unterschiede zwischen den behandelten und den unbehandelten Zähnen. Keine signifikanten Unterschiede ergaben sich zwischen der Ozongruppe und der zusätzlichen Anwendung der Remineralisationslösung. Es gibt auch Überlegungen ob Ozongas möglicherweise zur Kariesprävention eingesetzt werden kann (Knight *et al.*, 2008). Hierzu wurden in einer *in vitro* Studie 20 Dentinscheibchen mit Ozongas (4 g/m^3 , 40 s) behandelt, weitere 20 blieben unbehandelt. Anschließend wurden diese für vier Wochen in eine Bakteriensuspension gelegt. Auf den mit Ozon vorbehandelten Dentinscheibchen konnten *L. acidophilus* und *S. mutans* im Vergleich zu den unbehandelten keinen Biofilm aufbauen. Die Auswertung erfolgte mittels Sekundärelektronenmikroskop.

Aufgrund der antibakteriellen Eigenschaften wurde auch das Potential von Ozon in der Kavitätendesinfektion getestet (Polydorou *et al.*, 2012). In einer *ex vivo* Studie wurde anhand eines Kavitätenmodells die desinfizierende Wirkung von Ozongas (4 g/m^3 , 40 s) untersucht. Hierbei wurden Kavitäten in die Zähne präpariert, mit einer Bakteriensuspension gefüllt und für 48 h bei 36°C inkubiert. Es folgte eine Probenentnahme der unbehandelten Kavität und anschließend wurden die Kavitäten desinfiziert und eine Füllung gelegt. Nach vier und nach acht Wochen folgte wieder eine mikrobiologische Untersuchung. Dabei fand man eine signifikante Bakterienreduktion für *S. mutans*, für Laktobacillen konnte keine signifikante Reduktion festgestellt werden. In einer *in vivo* Studie mit 40 Kindern wurden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Bakterienreduktion durch die Kavitätendesinfektion mit Ozon (4 g/m^3 , 30 s) oder CHX (1 %, 30 s) gefunden (Hauser-Gerspach *et al.*, 2009). Hierbei wurde in einer Gruppe vor der Desinfektion die zerstörte Zahnhartsubstanz entfernt, in der anderen nicht. Auch diese Unterschiede waren nicht signifikant.

Wendet man Ozon in der Kavitätendesinfektion an, so kommt schnell die Frage auf, ob hierdurch möglicherweise die Haftung von Komposit zu Dentin und Schmelz verändert wird. In zahlreichen Studien ist man dieser Fragestellung mit den unterschiedlichsten Adhäsiven nachgegangen. So wurde die Mikrozughaftung zwischen Dentin und zwei selbstätzenden Adhäsivsystemen (Adapter Single Bond 2, XP Bond) mit 2 unterschiedlichen Kompositmaterialien untersucht (Z350, Esthet X) (Garcia *et al.*, 2012). Im ersten Experiment wurde die Dentinfläche vor Restauration mit Ozon (2100 ppm, 120 s), Ozonwasser (3,5 ppm, 60 ml/min, 120 s) oder

destilliertem Wasser (60 ml/min, 120 s) vorbehandelt. Im zweiten Experiment wurde die Zähne erst nach Bonding und Restauration mit Komposit desinfiziert. In beiden Experimenten wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden. Pires und Mitarbeiter untersuchten die Scherhaftung von 2 Adhäsivsystemen (Excite, Total-Etch und AdheSE, selbstätzendes Adhäsiv) mit am Zahnschmelz befestigten Kompositrestaurationen (Synergy D6) (Pires *et al.*, 2013). In zwei Versuchsgruppen wurde die Zahnoberfläche vor Applikation des Adhäsivs mit Ozon vorbehandelt. Es konnten keine signifikanten Veränderungen bezüglich der Scherhaftung durch die Anwendung von Ozon festgestellt werden. In einer anderen Studie wurde der Klebeverbund von Xeno III und Clearfil Protect Bond nach Desinfektion von Schmelz und Dentin mit Ozon (80 s, 4 g/m³) im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls nicht signifikant beeinflusst (Cadenaro *et al.*, 2009). Die Verbundfestigkeit von Dentin und Zahnschmelz mit Syntac Classic und Tetric EvoCeram wurde von Ozongas (4 g/m³) nicht signifikant beeinflusst (Schmidlin *et al.*, 2005). Die mechanischen Eigenschaften von vier getesteten Dentinadhäsiven (Prime & Bond NT, Excite, Syntac/Heliobond und Silorane System Adhesive) wurden durch die Anwendung von Ozongas (4 g/m³) nicht verändert (Magni *et al.*, 2008). Es waren auch bezüglich des Klebeverbundes von Komposit zu Komposit nach Ozongasapplikation keine signifikanten Unterschiede im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollgruppe nachzuweisen (Magni *et al.*, 2011). Weiter fanden Magni und Mitarbeiter heraus, dass die Anwendung keine negativen Auswirkungen auf die Mikrohärtigkeit von Dentin hat (Magni *et al.*, 2009).

Neben der Kariestherapie findet Ozon im Bereich der Endodontologie Anwendung. In einer *ex vivo* Untersuchung wurde die Desinfektionswirkung eines Kaliumtitanylphosphat Lasers (KTP Lasers) (1.5 W, 10 J/cm²) und Ozongas (120 s, 4 g/m³) getestet, während 2,5 % NaOCl als negative und NaCl als positive Kontrolle fungierten (Kuştarci *et al.*, 2009). Hierfür wurden zuvor Zähne mit nur einem Wurzelkanal für 24 h mit *E. faecalis* infiziert. Sowohl KTP Laser als auch Ozongas zeigten eine antibakterielle Wirkung, konnten allerdings im Vergleich zu NaOCl keine Bakterienreduktion auf null erreichen. Ozongas schnitt signifikant besser ab als der KTP Laser. In einer anderen *ex vivo* Studie, ebenfalls mit einkanaligen Zähnen und *E. faecalis* Biofilm, wurden die desinfizierende Wirkung von NaCl-Lösung (negativ Kontrolle), 1 % NaOCl für 120 s (positiv Kontrolle), NaCl-Spülung mit PUI (120 s),

Ozon (140 ppm, 120 s) und NaCl-Spülung mit PUI und Ozon untersucht (Case *et al.*, 2012). Dabei schnitt NaOCl am besten ab. Ozon alleine war nach diesem Protokoll signifikant schlechter als NaOCl, allerdings zusammen mit passiver Ultraschallaktivierung ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zu NaOCl. Eine mikrobiologische *in vivo* Untersuchung zur Effektivität von Ozongas (4 g/m³, 40 s) in der Wurzelkanal desinfektion ergab ausgehend von der Keimlast nach chemomechanischer Aufbereitung eine Bakterienreduktion von insgesamt 82 %. Aerobier wurden zu 67 % und Anaerobier sogar zu 93 % reduziert (Halbauer *et al.*, 2013). Für in der Endodontie eingesetzte Desinfektionsmittel ist deren Wirkung auf Biofilme von höchster Wichtigkeit. Ozongas und Ozonwasser in hohen Konzentrationen (> 32 g/m³, 20 µg/ml) erzielte in einer *in vitro* Studie im Vergleich zu herkömmlichen Spüllösungen (NaOCl 5,25 %, 2,25 %; CHX 2 % und H₂O₂ 3 %) gegenüber endopathogenen Keimen (*E. faecalis*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Peptostreptococcus micros*) vergleichbare Ergebnisse (Huth *et al.*, 2009). Die getesteten Desinfektionsmittel waren gegenüber Bakteriensuspensionen der einzelnen Keime effektiver als gegen deren Monospeziesbiofilme.

Soll im Anschluss an die Wurzelkanalbehandlung ein Glasfaserstift gesetzt werden, dann gilt auch bei der Verwendung von Ozon, dass das Befestigungsmaterial auf das Desinfektionsmittel abgestimmt sein sollte, um den bestmöglichen Verbund zu erzielen (Bitter *et al.*, 2008). Für CHX, Laser und Ozongas wurden in einer Studie die Wirkung auf den Klebeverbund zwischen Glasfaserstiften und Wurzelkanal mit Panavia F, Variolink II, RelyX Unicem und KetacCem als Befestigungsmaterialien untersucht. Bei der Befestigung von Glasfaserstiften mit Panavia F schnitt Ozongas (4 g/m³) im Vergleich zu Laser und CHX am besten, für RelyX Unicem am schlechtesten ab. Bei der Verwendung von Variolink II war der Klebeverbund bei der Desinfektion mit Laser signifikant am höchsten. Für die Anwendung von KetacCem gab es zwischen den drei Gruppen keine signifikanten Unterschiede. In einer anderen Untersuchung wurde die Auswirkung der Wurzelkanal desinfektion mit Ozongas oder Laser auf den Verbund von mit RelyX befestigten Glasfaserstiften zum Zahn getestet (Kıvanç *et al.*, 2012). Hierbei hatten sowohl Laser (Nd:YAG laser, Pulsmaster 600 IQ, 2,4W, 20 s) als auch Ozon (Ozontryon-Biozonix, 525 ppm, 20 s a 0,5 ml/s) keine negativen Auswirkungen auf den Verbund.

Ozon ist ein starkes Oxidationsmittel, so ist der Einsatz als mögliches Bleichmittel nahe liegend. In einer Studie wurde KJ-Gel, ein wasserbasiertes Gleitgel, mit Ozomax (175 µg/ml) ozoniert und dessen aufhellende sowie oberflächenaufrauende Wirkung auf Komposite im Vergleich zu Polierpaste und Carbamidperoxid überprüft (Elhamid und Mosallam, 2010). Dabei schnitt das ozoniert KJ-Gel signifikant am besten ab.

Auch die Wirkung von Ozon auf Hypersensitivitäten wurde bereits thematisiert. In einer placebokontrollierten doppelblinden Studie wurde die Effektivität von Ozon auf die Reduktion von Dentinhypersensitivitäten geprüft (Azapazhooh *et al.*, 2009). Es zeigten sich sowohl in der Ozon- als auch in der Placebogruppe signifikante Verbesserungen. Aufgrund des starken Placeboeffekts konnten allerdings keine Unterschiede zwischen den Gruppen ausgemacht werden. Bei der Behandlung überempfindlicher Zahnhälse wurde Ozon mit Kaliumoxalat und Fluorid, sowie die Kombinationen Ozon mit Fluorid und Ozon mit Kaliumoxalat verglichen (Raafat Abdelaziz *et al.*, 2011). Ozon alleine zeigte keinen Effekt auf das Verschließen von Dentintubuli, zusammen mit Fluorid wurde dessen Eigenschaft als Dentindesensitizer deutlich gesteigert. Die Kombination Ozon mit Kaliumoxalat zeigte keine Verbesserung.

Im Bereich Parodontologie und Implantologie ist, wie Studien zeigen, der Einsatz von Ozon ebenfalls möglich. Huth und Mitarbeiter, untersuchten die Wirkung von Ozongas, Ozonwasser, CHX sowie PBS als Negativkontrolle gegenüber vier parodontal pathogenen Keimen (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Parvimonas micra*) (Huth *et al.*, 2011). Die Wirkung der verwendeten Desinfektionsmittel wurde in unterschiedlichen Konzentrationen auf Monospeziesbakteriensuspensionen und Monospeziesbiofilme für je 1 min getestet. Dabei wurde eine signifikant höhere Wirksamkeit aller Desinfektionsmittel gegenüber Bakteriensuspensionen als gegen Biofilme beobachtet. Zwischen CHX 2 %, Ozongas 53 g/m³, und Ozonwasser 20 µg/ml wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. In einer *in vitro* Studie wurde die Wirkung von 140 ppm Ozon auf *S. sanguinis* und *P. gingivalis* sowie die Zelladhäsion von MG-63 Zellen auf mit Ozon behandelten Implantatoberflächen aus Titan (sandgestrahlt mit anschließender Ätzung und poliert) und Zirkon (geätzt und poliert) untersucht (Hauser-Gersbach *et al.*, 2012). Dabei zeigte sich, dass

P. gingivalis empfindlicher auf Ozon reagierte als *S. sanguinis*. Für *P. gingivalis* wurde auf allen Oberflächen eine Bakterienreduktion nach 24 s Ozongasbehandlung von $\geq 99,94$ % erreicht. Bei *S. sanguinis* schnitt die polierte Titanoberflächen mit 60 % Bakterienreduktion am schlechtesten und die polierte Zirkonoberfläche mit 91,7 % am besten ab. Die Behandlung der Implantatoberflächen wirkte sich im Experiment nicht negativ auf die Zelladhäsion von MG-63 Zellen aus.

Im Bereich der zahnärztlichen Chirurgie wurde in einer Studie der Einsatz eines Low Level Laser Therapie (LLLT) gegenüber Ozongas bei der Entfernung impaktierter unterer Molaren getestet (Kazancioglu *et al.*, 2014). Untersucht wurden die Häufigkeit des Auftretens vom Schmerzen, Schwellung und Kieferöffnungseinschränkungen post operationem. Ozongas und LLLT reduzierten den postoperativen Schmerz signifikant. Schwellung und Kieferöffnungseinschränkungen konnten durch den Einsatz der LLLT zusätzlich signifikant verbesserte werden. In einem Tierversuch wurde die Knochenheilung von gesunden Ratten und Ratten mit Hyperglykämie untersucht (Fraschino *et al.*, 2013). In histologischen Untersuchungen konnte nach Setzen einer Knochenwunde und Spülung mit Ozonwasser (0,004 mg/ml) unabhängig vom Blutglucosespiegel eine vermehrte Gefäßneubildung mit Osteoklastenmigration, aber ohne Beeinflussung der Trabekelneubildung beobachtet werden. In einem anderen Tierversuch wurde bei Ratten ein Knochendefekt in der Kalotte gesetzt (Ozdemir *et al.*, 2013). Die Negativkontrolle blieb unbehandelt. Die zwei Versuchsgruppen erhielten beide ein autologes Knochentransplantat und eine erhielt zusätzlich dreimal pro Woche, für 30 s, zwei Wochen lang, eine Ozongasbehandlung (4 g/m^3). Die Knochenheilung war in der Ozongruppe signifikant besser. Daraus wurde geschlussfolgert, dass Ozon einen förderlichen Effekt auf die Knochenneubildung hat.

Auch im Bereich Kieferorthopädie wurden mittels zahlreicher Studien die Einsatzmöglichkeiten von Ozon geprüft. In einer Studie mit zehn Patienten, welche in einer festsitzenden kieferorthopädischen Therapie waren, wurde die Bakterienbesiedelung elastischer Ligaturen untersucht (Aykut-Yetkiner *et al.*, 2013). Zur Anwendung kam Ozontyron OZ im Prophylaxemodus, mit welchem für 180 s eine Full-Mouth Desinfektion durchgeführt wurde. Hierbei konnte an den elastischen Ligaturen, im Vergleich zum Ausgangszustand, eine signifikante Bakterienreduktion festgestellt werden. Nach einer Woche wurde erneut die bakterielle Besiedelung der

Ligaturen untersucht. Hierbei war die Anzahl von *L. acidophilus* zum *S. mutans* wieder signifikant angestiegen, dabei lag *S. mutans* sogar signifikant höher als der Ausgangswert. In einer Pilotstudie wurden 15 kieferorthopädische Patienten mit Multibandapparatur und Gingivitis mit Ozonwasser (0,01 mg/l) behandelt (Dhingra und Vandana, 2011). Mit nur einer Spülung konnte die Laktatdehydrogenaseaktivität der Sulkusflüssigkeit und die Sekretion der Sulkusflüssigkeit, welche mit der Entzündung in Zusammenhang stehen, signifikant gesenkt werden. In einer *in vivo* Studie wurde der protektive Effekt bei kieferorthopädischen Patienten mit Multibandapparatur von Ozon (4 g/m³/ 30 s) im Vergleich zu Cervitec/Fluor Protector auf die Bildung von White Spots untersucht (Kronenberg *et al.*, 2009). Dabei wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt. In 0,7 % der Fälle wurden bei Cervitec/Fluor Protector und in 3,2 % der Fälle bei Ozon neue White Spots beobachtet. In einer Studie an extrahierten Zähnen wurde die Scherhaftung von kieferorthopädischen Brackets zum Zahnschmelz getestet (Cehreli *et al.*, 2010). Getestet wurden ein selbstätzendes System (Transbond Self-Etch Primer/Transbond XT) und ein Total-Etch-System (Transbond XT Primer/Transbond XT), einmal mit vorhergehender Ozonbehandlung (Biozonix, Ozonytron, 30s) und einmal zur Kontrolle ohne. Hierbei wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Allerdings blieb in den Ozongruppen beim Entfernen der Brackets signifikant weniger Komposit an den Zähnen kleben.

Aufgrund der desinfizierenden Wirkung von Ozonwasser ist dessen Einsatz im Bereich der Desinfektion von zahnärztlichen Instrumenten denkbar. In einer Studie hierzu wurden mit *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* und Sporen von *B. atrophaeus* kontaminierte Bohrer für 10 und 30 min in Ozonwasser (10 mg/l) behandelt (César *et al.*, 2012). Die größte Keimreduktion in CFU/ml wurde für *E. coli* erreicht mit 2,72-3,78 log-Stufen. Die Wirkung auf *B. atrophaeus* Sporen war mit noch einer Reduktion um 1,01-1,98 log-Stufen am geringsten.

1.4.3 Ozongeneratoren

Für den Einsatz von Ozon in der Zahnmedizin und der Medizin sind einige Geräte auf dem deutschen Markt erhältlich.

Das in der Studie eingesetzte Ozongerät *healOzone X4*, (Curozone GmbH, Wiesbaden, Deutschland) eignet sich für den Einsatz in der Kariestherapie sowie in

der Endodontie. Das mit Hilfe des Ozongenerators produzierte Ozongas wird über ein Handstück an dem gewünschten Ort appliziert. Damit kein Ozongas in die Umgebungsluft und somit in die Atemwege des Patienten und Behandlers gelangt, findet eine Abdichtung zwischen Handstück und Zahn mittels eines Silikonkappchens statt. Für den Einsatz in der Endodontie wird zusätzlich noch eine sterilisierbare Spülkanüle am Handstück angebracht, um das Ozon direkt in die Wurzelkanäle zu leiten. Zu Beginn wird ein Unterdruck aufgebaut. Nur wenn dies gelingt startet der Desinfektionsvorgang. Hierbei wird die Kavität oder der Wurzelkanal durch gleichzeitige Applikation und Absaugen von Ozongas gespült. Das wieder abgesaugte Ozon wird mittels eines eingebauten Ozonabsorbers inaktiviert. Dieses Gerät stellt eine Weiterentwicklung des healOzone 2130C Gerätes dar, was früher von der Firma KaVo (KaVo Dental GmbH, Biberach/Riß, Deutschland) vertrieben wurde. In einer Studie wurde für dieses Vorgängermodell eine sichere Anwendung am Patienten unter Einhaltung der Grenzwerte in der Einatemluft bestätigt (Millar und Hodson, 2007). Der wesentliche Unterschied zwischen den beiden Geräten ist vor allem die Ozonkonzentration mit der sie arbeiten. Das healOzone 2130C hatte nur eine Arbeitskonzentration von 4 g/m^3 . Das healOzone X4 arbeitet mit einer Konzentration von 32 g/m^3 im High Dosage Modus. In dieser Betriebsart wird dem Ozongenerator 100 % medizinischer Sauerstoff zugeführt. Im Low Dosage Modus wird über einen Lufttrockner gefilterte Umgebungsluft zugeführt. Die Ozonkonzentration hierbei beträgt allerdings nur 4 g/m^3 .

Die Firma W&H hat das Gerät Prozone auf dem Markt (W&H Deutschland GmbH, Laufen, Deutschland). Dieses Gerät eignet sich laut Hersteller für den Einsatz in der Kavitätesdesinfektion, der Parodontologie, der Endodontie sowie in der Chirurgie, nach Zahnextraktion oder vor Implantatinserktion. Dieses Gerät erzeugt das Ozon mittels Koronaentladungen aus getrockneter und gefilterter Umgebungsluft, liefert allerdings nur 140 ppm (entspricht ca. $0,28 \text{ g/m}^3$) Ozon und verfügt über keine Absaugvorrichtung.

Die Firma Dr. Hänsler bietet drei verschiedene Modelle von Ozongeneratoren an, welche sich sowohl zur direkten Ozongasbehandlung als auch zur Ozonwasserproduktion eignen (Dr. J. Hänsler GmbH, Iffezheim Deutschland). Das kompakte tragbare Gerät (OZONOSAN boardcase) liefert bis zu 50 µg/ml , das platzsparende Tischgerät (OZONOSAN phototonik) bis zu 75 µg/ml und das große

Standgerät mehr als 100 µg/ml Ozon. Der Hersteller bietet als Zubehör ozonfeste Kunststoffbeutel, Saugglocken zur Ozon-Unterdruckbegasung sowie Zubehör zur rektalen Ozon-Sauerstoff-Insufflation an.

Eine ähnliche Produktpalette weist die Firma Humares auf (Humares GmbH, Bruchsal, Deutschland). Diese hat vier verschiedene Modelle für den medizinischen Einsatz, darunter auch eines für den zahnmedizinischen Einsatz (Humadent) mit den entsprechenden Spitzen und Aufsätzen, im Programm. Die maximale Ozonkonzentration für das Humadent beträgt 70 µg/ml Ozon. Das Gerät verfügt zum Schutz der Atemwege des Patienten über keine Absaugvorrichtung. Die Geräte der Firma Dr. Hänsler und Humares benutzen für die Ozonproduktion reinen medizinischen Sauerstoff.

2 Fragestellung

Natriumhypochlorit ist ein bewährtes potentes Mittel zur Desinfektion des Wurzelkanals. Ozongas in der Konzentration von 32 g/m³ zeigte *in vitro* eine vergleichbare antimikrobielle Wirkung (Huth *et al.*, 2009). Ziel dieser randomisierten, kontrollierten, klinischen Studie war es zu untersuchen, in wie weit die *in vitro* Ergebnisse auf den Behandlungserfolg am Patienten übertragbar sind.

Die Arbeitshypothese war: Bei der Behandlung von apikalen Parodontitiden ist der Behandlungserfolg in der Ozongruppe vergleichbar mit dem in der NaOCl Gruppe hinsichtlich klinischer, röntgenologischer und mikrobiologischer Parameter.

3 Probanden und Methode

3.1 Studiendesign

Es handelt sich hierbei um eine prospektive, randomisierte, kontrollierte, einfach blinde, klinische Studie. Das Studienprotokoll wurde der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität München zur Prüfung vorgelegt und die ethische rechtliche Unbedenklichkeit bescheinigt (Nr. 018-11).

3.2 Patientenkollektiv

Die Patientengewinnung erfolgte über die Ambulanz der Abteilung für Zahnerhaltung und Parodontologie der Zahnklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München. Alle Patienten wurden im Zeitraum der Studiendurchführung auf nachfolgende Kriterien überprüft.

Einschlusskriterien für die Teilnahme an dieser Studie waren, das Vorliegen einer apikalen Parodontitis, an einem oder mehreren Zähnen von Erwachsenen, mit oder ohne akute Beschwerden. Als Ausschlusskriterien für die Teilnahme an dieser Studie wurde folgendes festgelegt: Nicht abgeschlossenes Wurzelwachstum, Wurzelfrakturen, Perforationen, topische oder systemische antibiotische Therapie in den letzten drei Monaten vor der Behandlung, allgemeinmedizinische Grunderkrankungen (nicht eingestellter Diabetes melitus, maligne Grunderkrankung, Z.n. Chemotherapie oder Radiatio, Immunsuppression und Xerostomie), eine frühere Wurzelkanalbehandlung an dem betroffenen Zahn, Minderjährigkeit sowie Fälle, in denen es nicht möglich war Kofferdam anzulegen. Oberkiefermolaren wurden in dieser Studie aufgrund der Möglichkeit der Überlappung von Strukturen im Röntgenbild und der damit möglicherweise verbundenen schwierigen Beschreibung des apikalen Heilungsverlaufs in der Röntgenkontrolle ausgeschlossen (Peters und Wesselink, 2002).

3.3 Ort und Zeitraum der Studiendurchführung

Die Untersuchung und Behandlung der Patienten wurde im Zeitraum von November 2010 bis Dezember 2014 an der Zahnklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München in der Abteilung für Zahnerhaltung und Parodontologie durchgeführt. In

nachfolgendem Flussdiagramm (*Abbildung 1*) wurde der Ablauf von der Patientengewinnung bis zur Datenanalyse nach 12 Monaten dargestellt.

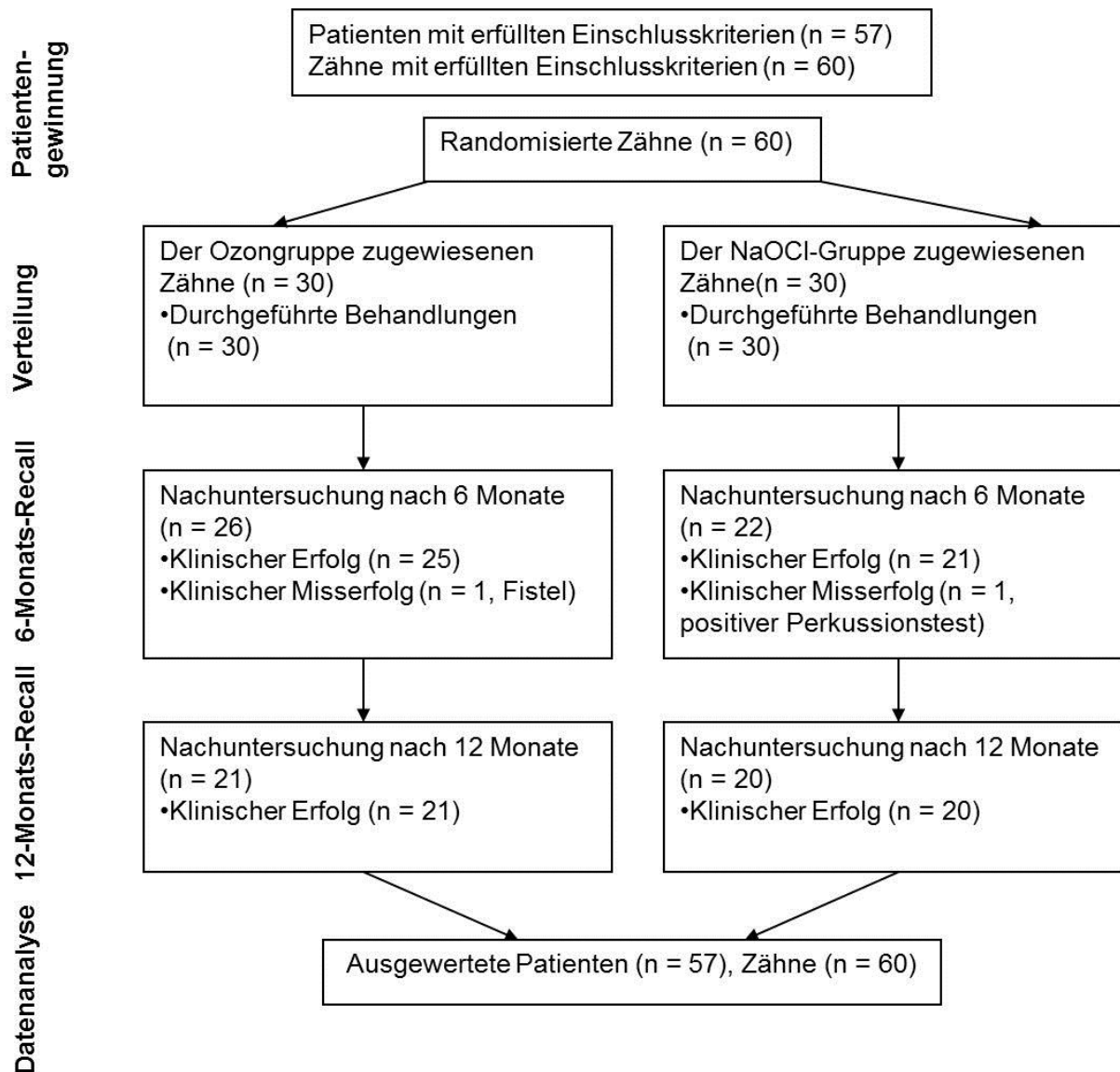


Abbildung 1: Flussdiagramm Studienverlauf

3.4 Interventionen

3.4.1 Basisuntersuchung

Nach Information der geeigneten Patienten über die Möglichkeit der Studienteilnahme wurden diese aufgeklärt sowie deren schriftliches Einverständnis mittels Aufklärungsbogen eingeholt (siehe Anhang, Kapitel 12.7). Bei der klinischen Untersuchung wurden folgende Parameter erhoben: Sensibilität, Schmerzen, Schwellung, Perkussion, apikaler Druckschmerz, Lockerungsgrad, das

Vorhandensein von einer Fistel oder eines Abszesses, 6-Punkt-Taschensondierungstiefe (TST) des betroffenen Zahnes und seiner Nachbarzähne sowie der generelle Zustand des Zahnes vor der Behandlung (Karies, Pulpa aperta, suffiziente/insuffiziente Versorgung oder Trauma).

Von dem betroffenen Zahn wurde ein diagnostisches apikales Röntgenbild in Paralleltechnik angefertigt (HELIODENT DS, Sirona Dental GmbH, Wals bei Salzburg, Österreich). Die Beurteilung und Klassifizierung des entzündungsbedingten Knochenabbaus erfolgte mittels des PAI nach Ørstavik (Ørstavik *et al.*, 1986). Das Ausmaß der pathologischen apikalen Veränderung wird hierbei in fünf Kategorien eingeteilt: 1 = Normalbefund, 2 = geringgradige Veränderung der Knochenstruktur, 3 = Knochenstrukturveränderungen mit geringer Dichteverminderung, 4 = gut abgegrenzte periapikale Osteolyse, 5 = schwere apikale Parodontitis mit Zeichen der Exazerbation. Hinsichtlich der Größe der Aufhellung erfolgte eine Zuordnung zu eine der folgenden drei Gruppen: kleiner 2 mm, 2-5 mm und größer 5 mm (größter Durchmesser der Aufhellung) (Molander *et al.*, 2007). Die Auswertung der Röntgenbilder wurde von zwei kalibrierten Untersuchern durchgeführt, welche nicht an der Behandlung beteiligt waren. Bei Abweichungen wurde die Auswertung gemeinsam wiederholt. Zusammen mit den pseudonymisierten Patientendaten wurden die genannten Parameter auf unserem Untersuchungsbogen notiert (siehe Anhang, Kapitel 12.8).

3.4.2 Wurzelkanalbehandlung mit mikrobiologischer Probenentnahme

Vor dem Beginn der Wurzelkanalbehandlung wurde der Zahn mit Scaler und Polierpaste (Zircate Prophyl Paste, DENTSPLY DeTray) gereinigt sowie Karies und alte insuffiziente Restaurationen entfernt. Der betroffene Zahn wurde durch Anlegen von Kofferdam einzeln gegen die Mundhöhle isoliert, um ein Eindringen von oralen Keimen in das Wurzelkanalsystem zu verhindern. Mit einem lichthärtenden Kunststoff (OpalDam, Ultradent Products Inc., UT, USA) wurde der dünne Spalt zwischen Kofferdam und Zahn abgedichtet. Anschließend wurde das Arbeitsfeld mit 30 % Wasserstoffperoxid (Apotheke Innenstadt Universität München, München, Deutschland) und einer 7,5-prozentigen Providon-Iodlösung (Braunol, B. Braun Melsungen AG) desinfiziert und trocken gepustet. Um sicher zu gehen, dass es sich bei den späteren Proben tatsächlich um Bakterien aus dem Wurzelkanalsystem

handelt und nicht um Verunreinigungen durch orale Keime wurde mit einem sterilisierten Wattepellet (Coltène/Whaledent AG, Altstätten, Schweiz) ein Abstrich von dem Zahn und der direkten Umgebung genommen (Probe 1).

Das Wattepellet wurde anschließend in ein kleines Probengefäß (Standard Reaktionsgefäß 3810X 1,5 ml; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) mit 0,6 ml Transportmedium (VMG-II; Möller, 1966) gegeben. Das Transportmedium ist so konzipiert, das es die Ernährung der Bakterien ermöglicht, gleichzeitig aber das Wachstum inhibiert. Somit ist die Anzahl der Mikroorganismen in dem Probengefäß über längere Zeit stabil (Syed und Loesche, 1972). Die Zubereitung aller Medien und Lösungen (VMG-I, VMG-II, Natriumthiosulfatlösung, Schädler-Agar, Columbia-Agar) sind im Anhang, in Kapitel 12.5, zu finden.

Die Eröffnung der Pulpa und die Präparation der Zugangskavität wurden mit diamantierten Bohrern (Gebr. Brasseler GmbH & Co. KG, Lemgo, Deutschland) durchgeführt. Für die Darstellung und Erweiterung der Kanaleingänge wurden Gates-Glidden Bohrer und Müller-Bohrer (Gebr. Brasseler GmbH & Co. KG) verwendet. Die korrekte Arbeitslänge wurde zunächst mittels Endometrie (Dentaport ZX, J. Morita Europe GmbH, Dietzenbach, Deutschland) bestimmt. Die Kanäle wurden mit einem Probeentnahmemedium (VMG-I) (Möller, 1966) gefüllt und mit Hedström-Feilen (VDW GmbH) (ISO 015) auf Arbeitslänge erweitert. Im Anschluss wurden die Kanäle, wenn es notwendig war, noch mal befüllt und dann die zweite Probe genommen. Hierzu wurden drei sterile Papierspitzen (VDW GmbH) nacheinander für je 10 s in den Kanal eingeführt und anschließend in das Transportmedium gegeben (VMG-II). Durch eine Röntgenmessaufnahme mit Feilen größer oder gleich ISO 015 wurde die Korrektheit der Arbeitslänge verifiziert. Die richtige Arbeitslänge für eine Wurzelkanalbehandlung wurde 1 mm koronal des radiologischen Apexes definiert (Voß, 2004). Die weitere Aufbereitung des Kanalsystems erfolgte maschinell (Endo IT professional, VDW GmbH) mit Nickel-Titan-Feilen (MTwo, VDW GmbH) bis zu einer Größe von maximal ISO 060/.04. Die Aufbereitungsgröße war abhängig vom Lumen des Kanals und der Stärke der Wurzel. Um eine apikale Verblockung des Kanals durch Dentinspäne zu verhindern wurde zwischen den einzelnen Feilen mit insgesamt 2 ml steriler Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %, B. Braun Melsungen AG) gespült. Nach der letzten Feile wurde der Kanal wieder mit dem Probeentnahmemedium gefüllt und mit einer sterilen Hedström-Feile ein paar

Dentinspänschen generiert. Im Anschluss wurden wieder drei Papierspitzen (ISO 015) nacheinander für je 10 s in den Wurzelkanal eingeführt und eine weitere Probe entnommen (Probe 3). Diese Probe diente der Auswertung der Keimlast nach mechanischer Aufbereitung. Vor der Desinfektion des Wurzelkanalsystems wurde die im Kanal entstandene Schmierschicht aus Dentin, Blut und nekrotischem Gewebe durch Spülung mit 5 ml 17 % EDTA-Lösung (EDTA 17 %, Apotheke Innenstadt Universität München) entfernt (Herrera *et al.*, 2013). Der Kanal wurde mit Papierspitzen entsprechend der Aufbereitungsgröße getrocknet.

In der Kontrollgruppe wurde das Wurzelkanalsystem mit NaOCl (NaOCl 3 %, Apotheke Innenstadt Universität München) über einen Zeitraum von 15 min gespült (*Abbildung 2*). Das ist die Zeit, die benötigt wird, um den Biofilm aufzulösen (Clegg *et al.*, 2006). Für die Bestimmung der Keimlast nach der Desinfektion wurde erneut eine Probe entnommen (Probe 4, *Abbildung 3*). Um eine definierte gleichbleibende Wirkdauer von NaOCl bei allen behandelte Zähnen zu erhalten, wurde NaOCl durch Spülen mit 5 ml 5-prozentiger Natriumthiosulfatlösung für 30 s inaktiviert und der Kanal mit Papierspitzen getrocknet (Pappen *et al.*, 2010; Siqueira *et al.*, 2007).

In der Testgruppe wurde der Wurzelkanal 120 s mit Ozongas (32 g/m^3) desinfiziert (healOzone X4, *Abbildung 4a und 4b*). Am Ende wurde der Kanal zur Inaktivierung des Ozongases für 30 s mit dem Probeentnahmemedium (VMG-I) gespült und wieder mit Papierspitzen getrocknet. Die Probenentnahme erfolgte wie in der Kontrollgruppe (Probe 4).



Abbildung 2: Desinfektion der Wurzelkanäle mit NaOCl

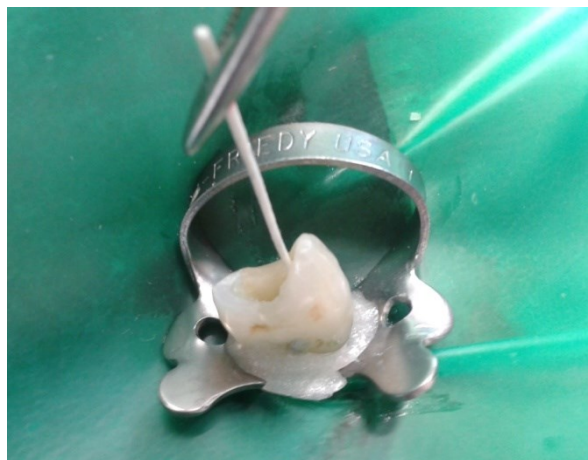


Abbildung 3: Probenentnahme mit Papierspitze



Abbildung 4a: healOzone X4



Abbildung 4b: Handstück (noch nicht vollständig auf Zahn aufgesetzt) mit Endokanüle und Silikonkappe

Nach Probeentnahme und Trocknung des Kanals wurde für eine Woche $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (UltraCal XS, Ultradent products, UT, USA) als Medikamenteneinlage in den Kanal gegeben (Estrela *et al.*, 2001; Mohammadi *et al.*, 2012). Danach wurde der Zahn zweischichtig provisorisch verschlossen. Die Kanaleingänge wurden mit einer 3 mm dicken Schicht aus provisorischem Zement abgedeckt und die restliche Zugangskavität mit einem stabileren bakteriendichten Glasionomierzement versiegelt (Cavit, Ketac Molar Aplicap, 3M Espe, Seefeld, Germany), um eine Reinfektion mit oralen Keimen innerhalb dieser Woche zu verhindern.

Der Patient wurde nach einer Woche wieder einbestellt und erneut eine Probe entnommen (Probe 5). Wie bereits oben beschrieben, wurde wieder Kofferdam angelegt und das Arbeitsfeld desinfiziert. Die provisorische Füllung wurde entfernt. Die $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Medikamenteneinlage wurde unter Verwendung einer sterilen Hedström-Feile (ISO 025) und 5 ml steriler Kochsalzlösung entfernt. Nun wurde noch einmal eine Probe entnommen zur Untersuchung ob Keime, die nach der Desinfektion noch vorhanden waren, durch die Medikamenteinlage abgetötet wurden oder ob es gar zu einer Reinfektion gekommen ist. Bei Beschwerdefreiheit erfolgte die Wurzelfüllung, ansonsten nur ein Medikamentenwechsel.

Vor Durchführung der Wurzelfüllung, wurde der Kanal in der Kontrollgruppe mit 5 ml CHX 2 % (SPEIKO - Dr. Speier GmbH, Münster, Deutschland) (Safavi und Spångberg, 2006) gespült und in der Testgruppe noch mal mit Ozongas für 120 s

desinfiziert. Nun wurde zur Verifizierung der Länge eine Masterpointaufnahme angefertigt.

Die Kanäle wurden mit Guttapercha (VDW GmbH) im lateralen Kompaktionsverfahren gefüllt. Hierfür wurde entsprechend der ISO-Größe und des Tapers der letzten Feile ein Masterguttaperchapoint eingebracht. Durch Kompaktion mit Hilfe von Spreadern und das Einbringen einiger zusätzlicher akzessorische Stifte (ISO 015/.02) wurde die Wurzelfüllung verdichtet. Die Guttaperchastifte wurden vor ihrer Verwendung mit einem Epoxytharz basierten Versiegler benetzt (AH Plus, DENTSPLY DeTray). Die Wurzelfüllung wurde auf Höhe der Schmelz-Zement-Grenze abgetrennt. Nun wurde eine Röntgenkontrollaufnahme angefertigt, um die Qualität der Wurzelfüllung bezüglich Länge und Homogenität beurteilen zu können (Lynch und Burke, 2006; Unal *et al.* modifiziert, 2011). Das Ergebnis der Beurteilung wurde im Dokumentationsbogen (siehe Anlage) festgehalten. Die Zugangskavität wurde mit einer Kompositfüllung verschlossen. Hierbei wurde der Zahnschmelz selektiv mit einer 37 % Phosphorsäure (Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Fürstentum Liechtenstein) angeätzt. Als Dentinhaftvermittler wurde ein lichthärtendes Adhäsivsystem mit selbstätzendem Primer (Clearfil, Clearfil SE Bond, Kuraray Europe GmbH, Hattersheim am Main, Deutschland) verwendet. Der Kanaleingang wurde zum einfacheren Wiederauffinden im Falle einer Revision mit einem Bleach-Komposit (Tetric BleachFlow, Ivoclar Vivadent AG) verschlossen, die restliche Kompositfüllung wurde zahnfarben gestaltet (Tetric EvoCeram, Ivoclar Vivadent AG). Abschließend erfolgte noch eine Beurteilung des Behandlungskomforts der durchgeführten Behandlungsmethode.

3.4.3 Nachuntersuchung

Nach 6 und nach 12 Monaten wurde der Patient zur Kontrolle wieder einbestellt. Es wurden dieselben klinischen und röntgenologischen Parameter wie in der Eingangsuntersuchung erhoben. Die Auswertung erfolgte durch die zwei kalibrierten, nicht in die Behandlung involvierten Untersucher, unabhängig voneinander. Der Nachuntersuchungsbogen ist im Anhang, in Kapitel 12.8, darstellt.

3.5 Mikrobiologische Probenaufbereitung

3.5.1 Bakterienkultur zur Quantifizierung der Keimlast

Aufgrund der Empfindlichkeit einiger Anaerobier gegenüber Sauerstoff, wurden alle Schritte des Verdünnens und der Ausplattierung in einer anaeroben Kammer durchgeführt (Bactron II, Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, OR, USA; *Abbildung 5*). Von den gesammelten Proben wurde mit steriler Kochsalzlösung eine serielle dezimale Verdünnungsreihe angefertigt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 50 µl pro Platte auf 2 Schädler-Agarplatten (Schädler Agar mit Vitamin K1 und 5 % Schafsblut; Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) zur anaeroben Bebrütung sowie auch auf 2 Columbia-Agarplatten (Columbia Agar mit 5 % Schafsblut; Becton Dickinson GmbH) zur aeroben Bebrütung ausplattiert (*Abbildung 7a und 7b*). Die Columbia-Agarplatten wurden aus der Anaerobierbank ausgeschleust und in einem CO₂-Inkubator (37 °C, 5,8 % CO₂, 60 % relative Luftfeuchtigkeit; Stericult 3311, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; *Abbildung 6*) für maximal 7 Tage bebrütet. Die Schädler-Agarplatten blieben in der anaeroben Kammer für maximal 21 Tage. Wurde nach dieser Zeit kein Bewuchs festgestellt wurde die Keimlast mit Null angegeben. Die Atmosphäre in dieser Kammer setzt sich aus 85 % N₂, 10 % CO₂ und 5 % H₂ zusammen (Downes *et al.*, 1990). Die kolonienbildenden Einheiten (CFUs) wurden nach morphologischen Gesichtspunkten unterschieden und visuell gezählt. Es wurde die Summe aller in ihrer Charakteristika gleichen CFUs sowie die Summe aller CFUs notiert. Die Anzahl der gezählten CFUs wurde zur Bestimmung der Keimlast mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert.



Abbildung 5: Bactron II



Abbildung 6: Stericult 3311



Abbildung 7a: Beimpfen der Agarplatte



Abbildung 7b: Ausplattieren auf Drehtisch

Für eine spätere Bakterienidentifizierung wurden mittels 3-Ösenausstrich Isolate von den sich in ihren morphologischen Merkmalen unterscheidenden Bakterienkolonien gemacht (*Abbildung 8a und 8b*). Diese wurden im Institut für Medizinische Mikrobiologie (Max-von-Pettenkofer Institut, Universität München, Prof. Dr. Schubert) durch eine massenspektrometrische Analyse von ribosomalen Proteinen mittels matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectroscopy (MALDI-TOF MS) identifiziert. Der Transport der Anaerobier erfolgte in Töpfen (Becton Dickinson GmbH) mit anaerober Atmosphäre, wobei ein GasPak (Becton Dickinson GmbH) mit in den Topf gegeben wurde, welches die anaerobe Atmosphäre durch Reaktion mit dem vorhandenen Sauerstoff erzeugte. Die im CO₂-Inkubator gewachsenen Keime wurden ohne besondere Behandlung versendet.



Abbildung 8a: Mischkultur einer 10³ verdünnten und ausplattierten Probe (Probe 1)



Abbildung 8b: Bakterienisolierung mittels 3-Ösenausstrich

3.5.2 Bakterienidentifizierung

3.5.2.1 MALDI-TOF Massenspektrometrie



Abbildung 9: Microflex LT Tischgerät

Hierfür wurde eine kleine Portion Bakterien (10^4 - 10^6) mit einem sterilen Zahnstocher von der Agarplatte entnommen und auf eine Analyseplatte aus Metall, das so genannte Target, aufgetragen (*Abbildung 10a*). Für jeden Keim wurde zur Qualitätssicherung, wie dies in der klinischen Diagnostik üblich ist, eine Doppelbestimmung durchgeführt. Als Positivkontrolle für die Kalibrierung des Gerätes wurde *E. coli* (ATCC 25922) aufgetragen. Um die Analyse zu erleichtern, wurden die Bakterien durch Überschichtung mit jeweils 1 μ l 70 % Ameisensäure behandelt, um eine teilweise Lyse der Zellwand zu erreichen (*Abbildung 10b*). Es

wurde kurz gewartet bis die Ameisensäure verdunstet war. Dann folgte die Überschichtung der Proben mit der für die Analyse notwendige Matrix (je 1 μ l α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland; *Abbildung 10c*), welche wir ebenfalls verdunsten ließen. Durch Co-Kristallisation wurde die Probe in die Matrix eingebettet. Nun wurde das Target in den MALDI-TOF MS (MALDI Biotyper System, Microflex LT Tischgerät mit flexControl 3.3 Steuersoftware, Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Deutschland; *Abbildung 9*) gegeben und die Analyse gestartet. Der MALDI-TOF MS erzeugt ein Hochvakuum und ein Laserstrahl verdampft die Matrix mit den eingebetteten Mikroorganismen explosionsartig. Die ionisierten Analyten werden in einem elektrischen Feld ($U_B = 10$ -30 kV) beschleunigt und die Flugzeit gemessen. Die meisten im Messbereich liegenden Analyten sind positiv geladene ribosomale Proteine mit einer Größe zwischen 2-20 kDa. Aufgrund unterschiedlicher Masse und Ladung der gemessenen Analyten ergibt sich für jeden Keim ein spezifisches Spektrum (*Abbildung 10d*). In der Studie wurde die MALDI-TOF Analyse im Linearmodus mit einer Laserfrequenz von 60 Hz, einer Beschleunigungsspannung von 20 kV, einer Spannung von 18,6 kV

der Ionenquelle 2 und einer verzögerten Ionenextraktion (extraction delay time) von 200 ns, zur Verbesserung der Auflösung, durchgeführt.

Durch Vergleich der gemessenen Spektren (MALDI Biotyper RTC 3.1 Software, Bruker Daltonics GmbH) mit einer Datenbank (Bruker Taxonomie Datenbank Version 4.0.0.1, Bruker Daltonics GmbH) wurden die Bakterien identifiziert. Die Datenauswertung erzeugt einen Zahlenwert (Score), der die Validität des Identifizierungsergebnisses angibt. Werte ≥ 2 lassen eine Identifizierung auf Spezies-Level und Werte zwischen 1,7 bis 1,99 auf Genus-Level zu. Kleinere Werte lassen keine sichere Identifizierung zu.

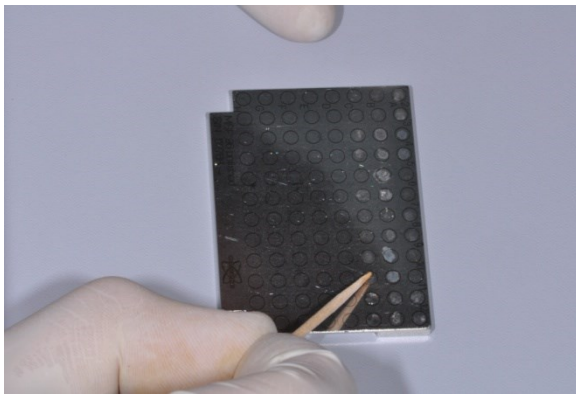


Abbildung 10a: Auftragung von Bakterien auf das Target

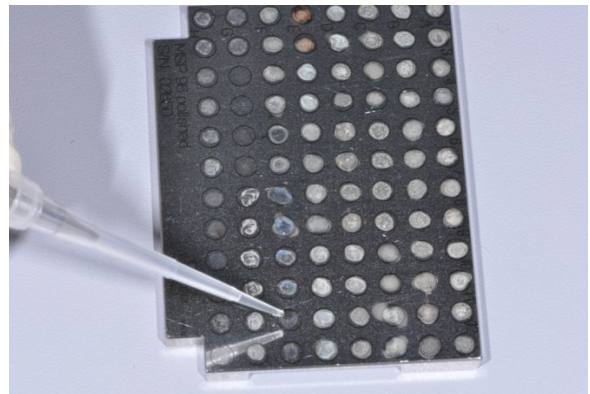


Abbildung 10b: Überschichten mit 70 % Ameisensäure

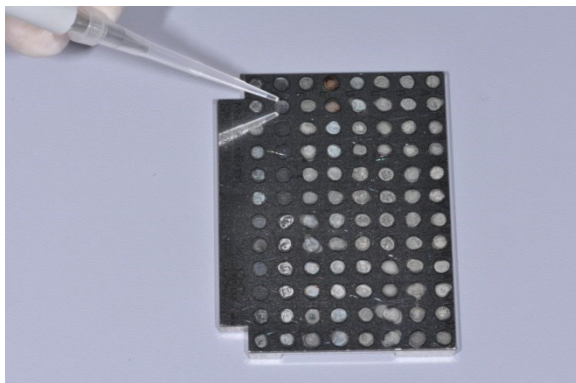


Abbildung 10c: Überschichten mit α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure

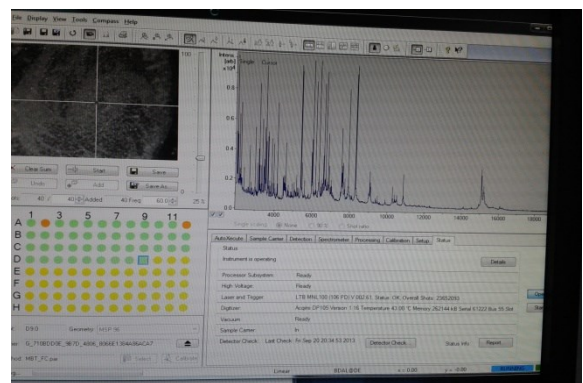


Abbildung 10d: MALDI-TOF Massenspektrum eines *Streptococcus salivarius*

3.5.2.2 Extraktionsmethode

In den Fällen, in denen die Massenspektroskopie keine Ergebnisse lieferte, wurde zuerst versucht durch das Verfahren der Extraktion eine MALDI/TOF Analyse zu ermöglichen. Bei der Extraktion geht es darum die Zellen zu lysieren und die ribosomalen Proteine der MALDI-TOF Analyse besser zuzuführen. Es wurden 300 µl destilliertes Wasser in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Eine etwa streichholzkopfgröße Menge des zu extrahierenden Keims wurde durch Reiben an der Gefäßwand in dem destillierten Wasser fein verteilt. Daraufhin wurde 900 µl reines Ethanol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) zugegeben und gevortext. Die Probe wurde 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Probengefäß auf einem Papiertuch ausgeklopft. Anschließend wurde die Probe erneut zentrifugiert. Der restliche Überstand wurde mit einer Pipette abgesaugt und verworfen. Das Probengefäß wurde eine Minute mit offenem Deckel stehen gelassen, damit der restliche Alkohol verdampft. Je nach Größe des Pellets wurden 10-50 µl 70 % Ameisensäure (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) hinzugegeben und dieses resuspendiert. Die gleiche Menge Acetonitril (100 %), als organisches Lösungsmittel (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) wurde dazu gegeben und gevortext. Im Anschluss daran wurden die Probe noch einmal 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert und 1 µl des klaren Überstandes auf das Target aufgetragen und getrocknet. Danach wurde wiederum Matrix darauf gegeben und mit der Analyse wie oben beschrieben weiter verfahren (Marklein *et al.*, 2009; Drevinek *et al.*, 2012).

In Fällen in denen auch dies nicht funktionierte, bzw. in denen der Keim nicht in der Datenbank vorhanden war, wurden die Keime durch Sequenzierung der 16S rRNA bestimmt.

3.5.2.3 Sequenzierung

In den Fällen in denen die MALDI-TOF Analyse keine suffizienten Ergebnisse lieferte wurde eine 16S rRNA Gensequenzierung durchgeführt. Mit Hilfe der Technik der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde die 16S rRNA amplifiziert. Hierzu wurden universelle prokariotische Primer (fD1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 800r: 5'-CTACCAGGGTATCTAATCC-3') verwendet und ein ca. 800 Basenpaare langes PCR Produkt gewonnen (Al Masalma *et al.*, 2009). Die Reinigung der DNA und Sequenzierung der Amplifikate wurde durch eine externe Firma durchgeführt

(Eurofine Medigenomix GmbH Ebersberg, Germany). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Gendatenbanken abgeglichen (GenBank; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> und SepsitTest™ Blast; <http://www.sepsitest-blast.de>). Nach den Kriterien für korrekte Identifizierung der CLSI Richtlinien MM18-A, lässt eine Übereinstimmung von $\geq 97\%$ eine Identifizierung auf Genus-Level und $\geq 99\%$ auf Spezies-Level zu (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008).

3.6 Datenanalyse

3.6.1 Ziele der Datenanalyse

Primär wurde der röntgenologische Heilungsverlauf durch Betrachtung der PAI-Werte und der Größe der apikalen Läsion nach 6 und 12 Monaten im Vergleich zur Eingangsuntersuchung ausgewertet. Sekundär wurden die vorhandenen klinischen Symptome nach 6 und 12 Monate ausgewertet. Mit Hilfe der röntgenologischen und klinischen Daten wurde auch die Erfolgsrate der endodontischen Behandlung für die zwei Gruppen berechnet. Erfolgskriterien waren: Keine klinische Symptomatik sowie ein Rückgang der apikalen Aufhellung im Röntgenbild im Vergleich zum Ausgangsbefund. Misserfolgskriterien waren: Klinische Symptome und/oder keine Verbesserung hinsichtlich der röntgenologischen Situation oder sogar eine Verschlechterung (Peters und Wesselink, 2002). Im Falle eines Misserfolgs wurde der Patient einer Revision zugeführt. Zusätzlich fand eine Auswertung der Effektivität der zwei Desinfektionsprotokolle hinsichtlich der Reduktion der Bakterienlast in den Unterschiedlichen Proben statt.

3.6.2 Fallzahlberechnung

Die Fallzahlberechnung basierte auf zwei vergleichbaren Studien, welche eine mittlerer Differenz von 0,5 PAI Einheiten bei den Nachuntersuchungen zwischen den Gruppen als klinisch relevant angegeben hatten (Penesis *et al.*, 2008; Paredes-Vieyra und Enriquez, 2012) und einer internen Pilotstudie der ersten zehn Fälle jeder Gruppe mit der höchsten Standardabweichung des PAI von 0,63 Einheiten nach 6 Monaten. Auf diesen Werten basierend wurde eine Fallzahlberechnung (PS Power und Sample Size Calculation Program, Version 2.1.31) (Dupont und Plummer, 1990) durchgeführt. Die Berechnung verlangte 26 Patienten pro Gruppe, um signifikante Unterschiede im Behandlungsergebnis feststellen zu können (Power 80 %, α -Level

0,05). Aufgrund möglicher Ausfälle planten wir vorsichtshalber 30 Zähne pro Gruppe ein.

3.6.3 Randomisierung und Verblindung

Alle Patienten, welche die Einschlusskriterien erfüllten, wurden mittels eines Randomisierungsprogrammes einer Behandlungsgruppe (Ozon oder NaOCl) zugeordnet (SPSS, Version 19, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Die Behandlungen wurden von zwei in der Endodontie erfahrenen Zahnärzten, mit mehr als zehn Jahren Berufserfahrung, durchgeführt. Beide Desinfektionsprotokolle wurden vor Studienbeginn von beiden Behandlern trainiert, hierbei führten sie jeweils fünf Behandlungen durch. Die Nachuntersuchungen wurden von zwei anderen, nicht in die Behandlung involvierten, Zahnärzten durchgeführt. Einen Monat vor Studienstart wurden die Nachuntersucher in der Beurteilung der klinischen und röntgenologischen Ergebnisse an 20 früheren endodontologischen Fällen trainiert und kalibriert. Die Datenanalyse und Auswertung wurde ohne Kenntnis des Behandlungsprotokolls gemacht. Die Röntgenbilder sowie die mikrobiologischen Proben wurden hierfür durch Codierung unkenntlich gemacht.

3.6.4 Statistik

Die gesammelten Daten des Patientenkollektives wurden hinsichtlich Geschlecht, Alter und Zahnart deskriptiv angegeben, ebenso wie die klinische und radiologische Situation vor und nach der Behandlung. Um festzustellen in wie weit ein Behandler seine Röntgenbilder immer gleich befundet, bzw. zwischen den Behandlern die Röntgenbilder immer gleich beurteilt werden, wurden nach einem zeitlichen Intervall von 4 Wochen die Hälfte der Röntgenbilder erneut ausgewertet und die Intrarater- sowie die Interrater-Reliabilität mit der Cohen's unweight kappa Statistik bestimmt (Cohen 1960).

Die sechs und zwölf Monats Erfolgs- bzw. Misserfolgsquote für beide Gruppen wurde mit nachfolgender Formel (Li und Powers, 1999) berechnet, und auf Signifikanz getestet mit Hilfe eines Fischer Exakt Tests.

$$\text{Misserfolgsquote} = 100 \% \times \frac{(\text{frühere Misserfolge} + \text{neue Misserfolge})}{(\text{frühere Misserfolge} + \text{aktuell nachuntersuchte Wurzelkanalbehandlung})}$$

In Bezug auf die Veränderung des PAI und der Größe der apikalen Läsion nach 6 und 12 Monaten wurden die zwei Gruppen miteinander verglichen (Mann-Whitney-U Test, α -Level 0,05). Der Heilungsverlauf innerhalb der Gruppen, das heißt ebenfalls die Veränderung des PAI und der Größe der apikalen Läsion nach 6 und nach 12 Monaten im Bezug zur Diagnoseaufnahme und zwischen 6 und 12 Monaten wurde auf Signifikanz getestet (Wilcoxon Test, α -Level von $< 0,05$ mit Bonferroni Korrektur angepasst für drei multiple Tests). Zusätzlich wurde der Einfluss jedes einzelnen der eingangs beobachteten Symptome auf den röntgenologischen Heilungsverlauf nach 6 und 12 Monaten getestet (Mann-Whitney-U Test, α -Level $< 0,05$).

Die mikrobiologischen Daten in Bezug auf Bakterienlast während den unterschiedlichen Zeitpunkten der Behandlung, die Anzahl unterschiedlicher Spezies in den Proben und die am häufigsten aufgetretenen Genera wurden zunächst deskriptiv angegeben. Es folgte die prozentuale Angabe der jeweiligen Bakterienreduktion zwischen den Behandlungsschritten und deren Vergleich zwischen den Versuchsgruppen (Mann-Whitney-U Test, α -Level $< 0,05$) sowie innerhalb der Gruppen (Wilcoxon Test, α -Level von $< 0,05$ mit Bonferroni Korrektur angepasst für fünf multiple Tests). Zum Schluss wurde auch noch ein möglicher Einfluss von einer Bakterienreduktion auf null zum Zeitpunkt der Wurzelkanalfüllung, d.h. nach Probe 4, auf den röntgenologischen Heilungsverlauf getestet (Mann-Whitney-U Test, α -Level $< 0,05$).

4 Ergebnisse

4.1 Klinische und röntgenologische Ergebnisse

Für die Studie wurden 104 Patienten untersucht, wovon 57 Patienten (Frauen $n = 23$, Männer $n = 34$; durchschnittliches Alter $51,9 \pm 18,4$ Jahre) mit 60 bleibenden Zähnen (Oberkiefer $n = 25$, Unterkiefer $n = 35$; Molaren $n = 15$, Prämolaren $n = 24$, Frontzähne $n = 21$) geeignet waren und in die Teilnahme an der Studie einwilligten. Hierbei wurde die Hälfte ($n = 30$) nach dem Ozongasprotokoll und die andere Hälfte nach dem NaOCl-Spülprotokoll behandelt. Die Recallquote in der Ozongruppe war nach 6 Monaten bei 87 % ($n = 26$) und nach 12 Monaten bei 70 % ($n = 21$), in der NaOCl-Gruppe 73 % ($n = 22$) nach 6 Monaten und 67 % ($n = 20$) nach 12 Monaten. Die Intrarater-Reliabilität (Cohens Kappa) der röntgenologischen Auswertung betrug 0,55 (PAI) und 0,67 (Größe der apikalen Läsion) für den ersten Untersucher und 0,63 (PAI) und 0,61 (Größe der apikalen Läsion) für den zweiten Untersucher. Die Interrater-Reliabilität lag bei 0,54 (PAI) und 0,57 (Größe der apikalen Läsion).

In Bezug auf die vorher definierten Erfolgs-/Misserfolgskriterien zeigte sich in der Ozongruppe nach 6 Monaten eine Fistel mit apikaler Läsion unverändert Größe und in der NaOCl-Gruppe ein positiver Perkussionstest. Demnach lag die Erfolgsrate in der Ozongruppe bei 96,2 % nach 6 und 95,5 % nach 12 Monaten, die Misserfolgsrate bei 3,8 % und 4,5 %. In der NaOCl-Gruppe lag die Erfolgsrate bei 95,5 % nach 6 Monaten und 95,2 % nach 12 Monaten, die Misserfolgsrate bei 4,5 % und 4,8 %. Zwischen den zwei Versuchsgruppen konnten hinsichtlich der Erfolgsrate keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Exakter Fisher-Test, $p > 0,05$).

Die in der Studie erhobenen klinischen (*Tabelle 1*) und röntgenologischen (*Tabelle 2*) Daten des Patientenkollektives vor der Behandlung sowie nach 6 und 12 Monaten wurden nachfolgend tabellarisch dargestellt.

Klinische Parameter	Vor der Behandlung		Nach 6 Monaten		Nach 12 Monaten	
	Ozon n = 30	NaOCl n = 30	Ozon n = 26	NaOCl n = 22	Ozon n = 21	NaOCl n = 20
Schmerzen	12	10	0	0	0	0
Schwellung	3	2	0	0	0	0
Perkussionstest (<i>positiv</i>)	12	19	0	1	0	0
apikaler Druckschmerz	12	8	0	0	0	0
Zahnlockerung	6	3	2	2	1	1
Fistel	7	3	1	0	0	0
Abszess	1	1	0	0	0	0
Taschensondierungstiefe > 3 mm (behandelnder Zahn)	14	12	8	8	4	6
Taschensondierungstiefe > 3 mm (Nachbarzähne)	8	9	8	6	3	2
Asymptomatische Zähne	3	4	13	13	17	14

Tabelle 1: Klinische Daten des Patientenkollektives vor der Behandlung sowie nach 6 und 12 Monaten

Röntgenologische Parameter	Vor der Behandlung		Nach 6 Monaten		Nach 12 Monaten	
	Ozon n = 30	NaOCl n = 30	Ozon n = 26	NaOCl n = 22	Ozon n = 21	NaOCl n = 20
Größe der apikalen Läsion						
< 2 mm	0	1	9	4	14	13
2-5 mm	12	9	13	13	6	5
> 5 mm	18	20	4	5	1	2
Periapikaler Index (PAI)						
1	0	0	5	2	13	10
2	2	4	9	6	7	8
3	8	8	9	12	1	2
4	16	13	2	2	0	0
5	4	5	1	0	0	0

Tabelle 2: Röntgenologische Untersuchungsergebnisse vor Behandlungsbeginn sowie nach 6 und 12 Monate

Ein Vergleich der Daten bezüglich des PAI und der Größe der apikalen Läsion zu Behandlungsbeginn zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Mann-Whitney-U Test, $p > 0,05$). Auch nach 6 Monaten (Mann-Whitney-U Test, $p = 0,311$ für PAI, $p = 0,22$ für Größe der apikalen Läsion) und 12 Monaten ($p = 0,491$ für PAI, $p = 0,915$ für Größe der apikalen Läsion) ließen sich zwischen den Gruppen hinsichtlich des röntgenologischen Standes des Heilungsprozess keine signifikanten Unterschiede feststellen, wohl aber innerhalb der jeweiligen Gruppen. Bezüglich des PAI und der Größe der apikalen Läsion konnte sowohl in der Ozon- als auch in der NaOCl-Gruppe zwischen Ausgangssituation und 6-Monats-Recall ein signifikanter Rückgang verzeichnet werden (Wilcoxon Test, $p < 0,0001$). Zwischen 6- und 12- Monats-Recall konnte eine weitere röntgenologische Heilung beobachtet werden, diese war allerdings aufgrund der Anpassung des alpha-Levels nach Bonferroni für multiples Testen nicht mehr signifikant ($p = 0,003$ für NaOCl Gruppe, $p = 0,035$ für Ozongruppe).

Das Beschwerdebild bei apikaler Parodontitis variierte sehr stark (*Tabelle 1*). Es wurde untersucht, ob das Vorhandensein einzelner Symptome zu Beginn Auswirkungen auf den Rückgang des PAI oder die Größe der apikalen Läsion hat. Hierbei wurden keine signifikanten Zusammenhänge gefunden (Mann-Whitney-U Test, $p > 0,05$).

4.2 Mikrobiologische Ergebnisse

Die Sterilitätsproben (Probe 0) der zur Trepanation vorbereitenden Zähne waren alle negativ. Die Bakterienlast in den Wurzelkanälen, unmittelbar nach Trepanation (Probe 1), betrug in der Ozongruppe $9,4 \times 10^5$ CFUs/ml (Median) mit einem Minimum von $2,3 \times 10^3$ und einem Maximum von $3,6 \times 10^7$ CFUs/ml, in der NaOCl Gruppe $8,9 \times 10^5$ CFUs/ml mit einem Minimum von $8,8 \times 10^2$ und einem Maximum von $4,6 \times 10^7$ CFUs/ml. Die Bakterienlast war zu Beginn zwischen den zwei Gruppen nicht signifikant verschieden (Mann-Whitney-U Test, $p > 0,05$). Die Anzahl der gefundenen Spezies pro Fall variierte zwischen einem und 14 unterschiedlichen mit einem Median von 5. Die drei am häufigsten beobachteten Genera waren *Streptococcus spp.*, gefolgt von *Parvimonas spp.* und *Prevotella spp.*. Die Bakterienlast in den Proben 1 bis 4 (Mittelwert \pm Standardabweichung), die Anzahl unterschiedlicher Spezies zu den unterschiedlichen Behandlungszeitpunkten sowie

die in der Studie am häufigsten gefunden Genera sind in den *Abbildungen 11-13* dargestellt.

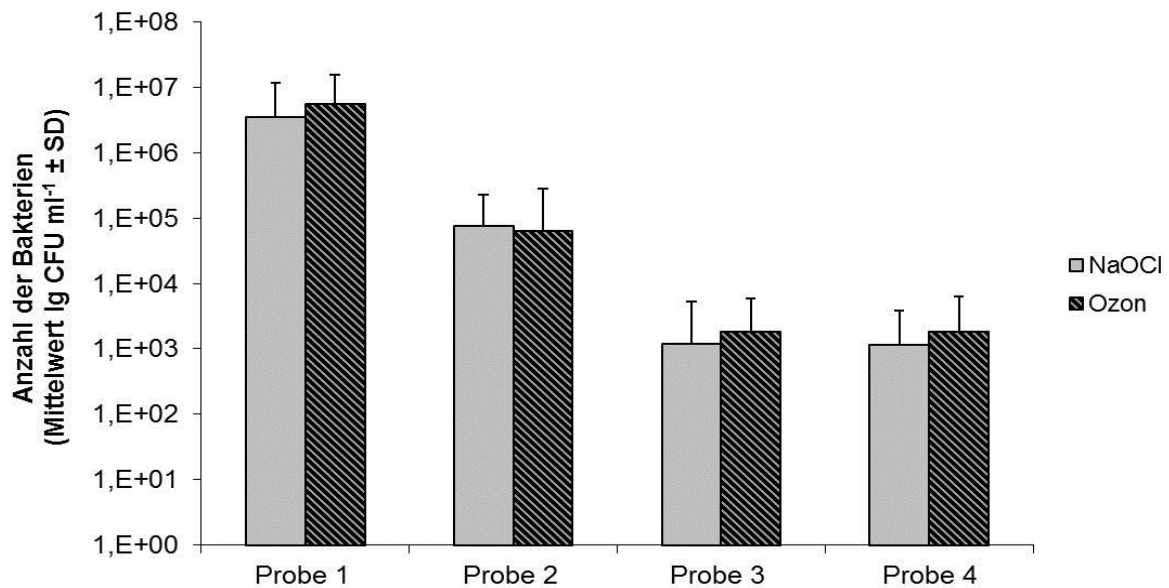


Abbildung 11: Mittlere Bakterienanzahl während den unterschiedlichen Abschnitten der Wurzelkanalbehandlung in halblogarithmischer Darstellung mit Standardabweichung

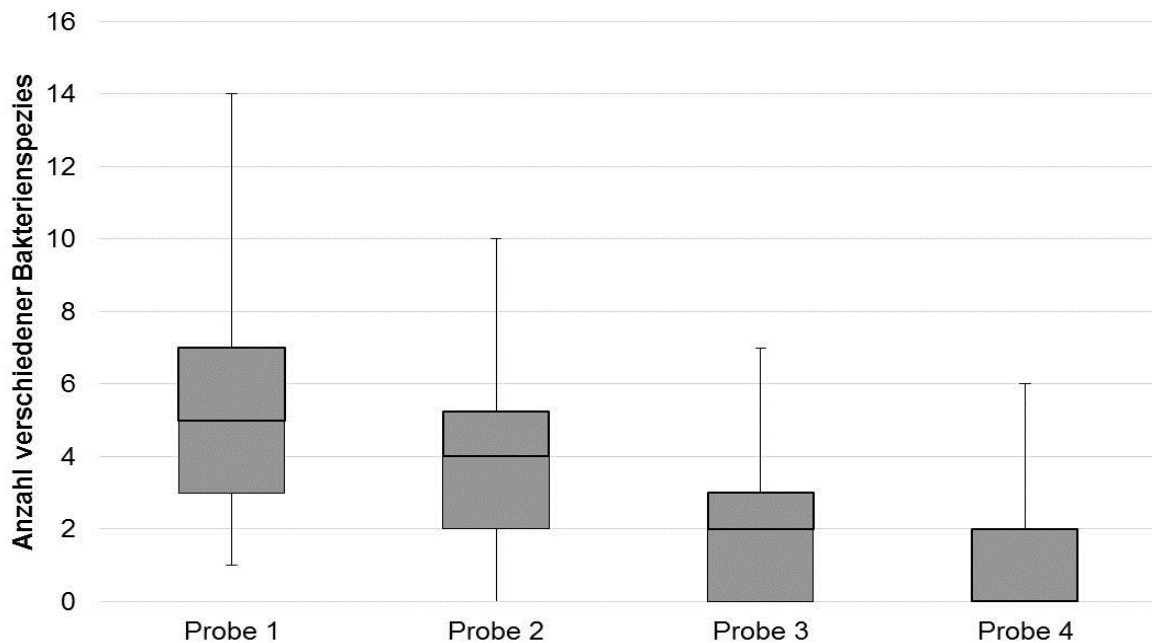


Abbildung 12: Box-Whisker-Plot, Darstellung der Anzahl verschiedener Bakterienspezies während den unterschiedlichen Abschnitten der Wurzelkanalbehandlung

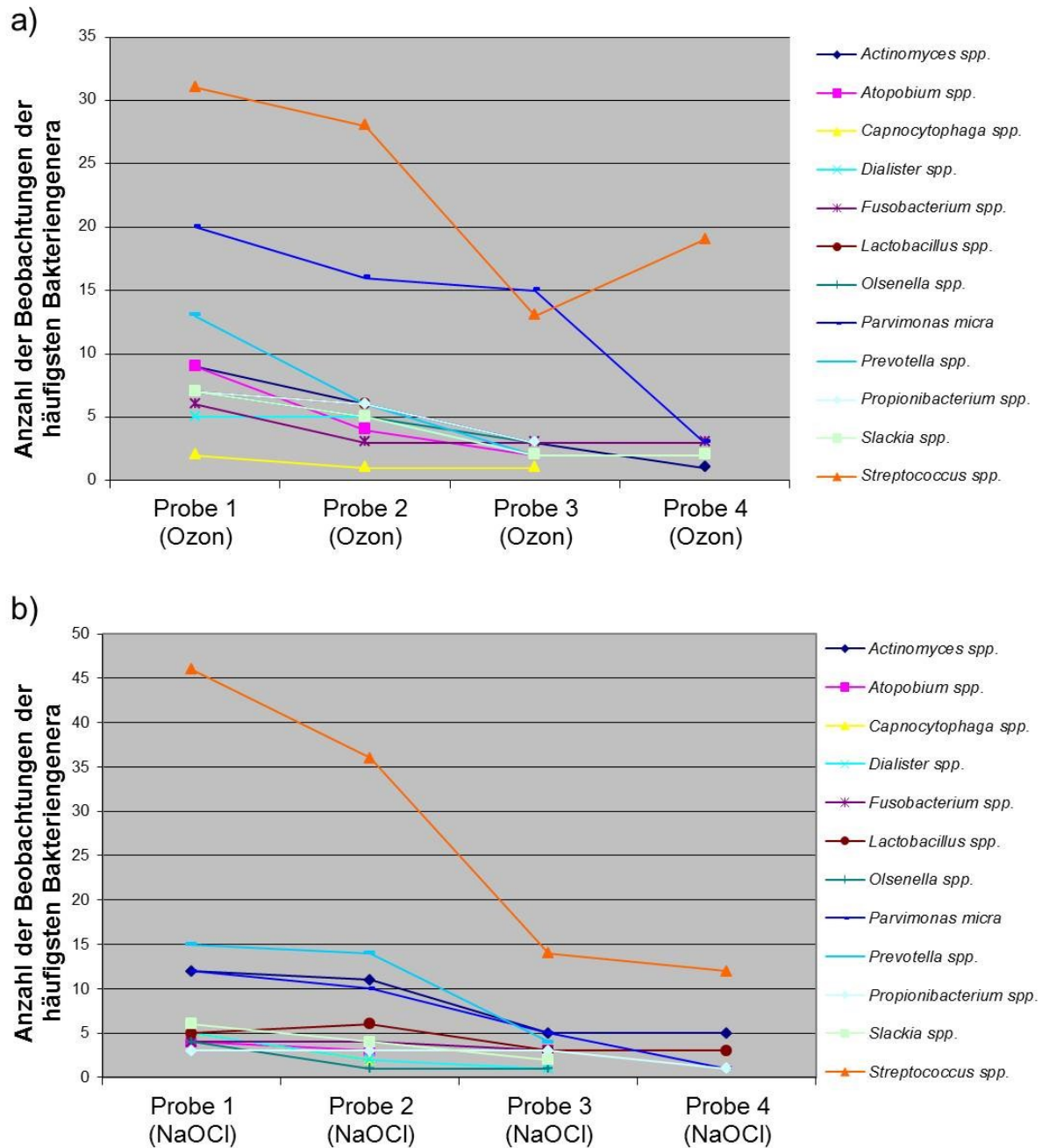


Abbildung 13: Anzahl der am häufigsten beobachteten Bakteriengenera a) in der Ozongruppe, b) in der NaOCl Gruppe

Die Bakterienreduktionen der zwei Versuchsgruppen nach mechanischer Aufbereitung (Probe 2), nach Wurzelkanal desinfektion (Probe 3) und nach einwöchiger Medikamenteneinlage (Probe 4) waren recht ähnlich wie die nachfolgende Tabelle zeigt (Tabelle 3). Ebenso der Vergleich der rein chemisch verursachten Bakterienreduktion zwischen Probe 2 und 3, bei der die restliche Bakterienlast nach der mechanischen Aufbereitung auf 100 % gesetzt wurde.

Reduktion (%) zwischen Probe:	1 und 2	1 und 3	1 und 4	2 und 3
Ozon (n = 30)				
Mittelwert	97,65	99,19	98,52	85,83
Standardabweichung	4,47	3,98	4,92	27,46
Median	99,31	99,98	100,00	96,64
Minimum	77,45	78,14	76,65	3,03
Maximum	100,00	100,00	100,00	100,00
Wilcoxon Test, p	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
NaOCl (n = 30)				
Mittelwert	95,92	99,87	99,40	87,21
Standardabweichung	6,71	0,33	1,92	38,82
Median	98,45	100,00	100,00	99,94
Minimum	67,33	98,52	90,90	22,99
Maximum	99,92	100,00	100,00	100,00
Wilcoxon Test, p	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

Tabelle 3: Ergebnisse der Bakterienreduktion zwischen den verschiedenen Behandlungsschritten

Die statistische Auswertung zeigte keine signifikanten Unterschiede der Bakterienreduktion zwischen den Gruppen durch die mechanische Aufbereitung, was bedeutet, dass die Ausgangsbedingungen für die zwei unterschiedliche Desinfektionsprotokolle vergleichbar waren (Mann-Whitney-U Test, $p = 0,089$). Der Vergleich der Bakterienreduktion zwischen den Gruppen nach Wurzelkanal desinfektion (zwischen Probe 1 und 3 $p = 0,439$, zwischen Probe 2 und 3 $p = 0,107$) sowie nach Medikamenteneinlage ($p = 0,857$) lieferte keine signifikanten Unterschiede. Die Bakterienreduktionen innerhalb der Gruppen, das heißt von initial (Probe 1) zu postmechanisch (Probe 2), von initial zu postchemisch (Probe 3) und von postmechanisch zu postchemisch waren signifikant (Wilcoxon Test, $p < 0,0001$) (Table 3). Hingegen die Reduktion zwischen der Wurzelkanal desinfektion (Probe 3) und der Medikamenteneinlage (Probe 4) in beiden Gruppen war nicht signifikant (Wilcoxon Test, $p = 0,989$ für NaOCl Gruppe, $p = 0,346$ für Ozongruppe). Die Medikamenteneinlage konnte in 14/30 Fällen in der NaOCl Gruppe und in 17/30 Fällen in der Ozongruppe die verbleibende Bakterienlast nach Wurzelkanal desinfektion weiter vermindern. In 10/30 Fällen in der NaOCl Gruppe

und in 6/30 Fällen in der Ozongruppe kam es allerdings zu einem erneuten Anstieg der Bakterienanzahl. In 6 Fällen der NaOCl Gruppe und 7 Fällen der Ozongruppe konnte eine erreichte Bakterienreduktion auf null für den Zeitraum der Medikamenteneinlage aufrechterhalten werden. Bei beiden oben berichteten Misserfolgen gelang eine vollständige Bakterienreduktion nicht, es waren zum Zeitpunkt der Wurzelkanalfüllung (Probe 4) noch Bakterien nachweisbar (NaOCl Gruppe: 10^4 , Ozongruppe: 10^2).

In der Ozongruppe waren nach der mechanischen Aufbereitung (Probe 2) in 3 Fällen, nach der Wurzelkanaldesinfektion (Probe 3) in 10 Fällen und nach der einwöchigen Medikamenteneinlage (Probe 4) in 18 Fällen keine Bakterien mehr nachweisbar. In der NaOCl Gruppe sah es ähnlich aus. Hier waren nach der mechanischen Aufbereitung keine, nach der Wurzelkanaldesinfektion 12 und nach der Medikamenteneinlage 16 Fälle ohne nachweisbare Bakterien. Untersucht wurde ob sich eine vollständige Bakterienreduktion zum Zeitpunkt der Wurzelkanalfüllung auf die röntgenologische Heilung (PAI, Größe der apikalen Läsion) auswirkt. Hier wurden zwischen den gebildeten Gruppen „Keine Bakterien mehr nachweisbar“ und „verbleibende Bakterien“, aus allen Fällen dieser Studie (Ozon und NaOCl), keine signifikanten Unterschiede gefunden (Mann-Whitney-U Test, $p = 0,105$ für PAI, $p = 0,205$ für Größe der apikalen Läsion).

Zusammenfassend kann man sagen, die Arbeitshypothese, dass beide Desinfektionsprotokolle vergleichbare Ergebnisse liefern, konnte bestätigt werden.

4.3 Fallbeispiele

Exemplarisch wurde zur Darstellung einer Wurzelkanalbehandlung und des Heilungsverlaufes jeweils ein Fall aus jeder Behandlungsgruppe herausgegriffen.

4.3.1 Fall 1

In der Ambulanz der Abteilung Zahnerhaltung und Parodontologie der Universität München wurde ein 28-jähriger Patient vorstellig. Er berichtete von einem kleinen gelblichen Punkt in Regio 15 aus welchem sich bereits mehrfach auf Druck Eiter entleerte, Schmerzen habe er keine. Die eingehende Untersuchung lieferte folgende Befunde: Perkussionstest negativ, Sensibilitätstest negativ (Kältetest), keine Schwellung, kein apikaler Druckschmerz, kein Abszess, keine Lockerung, eine Fistel und Taschensondierungstiefen von 5 mm am Zahn 15, 3 mm an den Nachbarzähnen. Weiter war am Zahn 15 eine insuffiziente Füllung zu beobachten. Vom Zahn 15 wurde ein Röntgenbild mit Darstellung der Wurzel angefertigt (*Abbildung 14*). Zu sehen war eine gut abgrenzbare periapikale Osteolyse (PAI = 4) > 5 mm Durchmesser. Der Patient wurde nach dem NaOCl Protokoll behandelt. Nachfolgend sind die während der Wurzelkanalbehandlung entstandene Röntgenmessaufnahme (*Abbildung 15*), Masterpointaufnahme (*Abbildung 16*) und Kontrollaufnahme der fertigen Wurzelkanalfüllung (*Abbildung 17*) dargestellt.

Nach 6 Monaten fanden wir noch Knochenstrukturveränderungen mit geringer Dichteverminderung (PAI = 3) und einem kleinen Durchmesser der apikalen Läsion zwischen 2-5 mm (*Abbildung 18*). Nach 12 Monaten diagnostizierten wir nur noch eine geringgradige Veränderung der Knochenstruktur (PAI = 2) mit einem Durchmesser zwischen 2-5 mm (*Abbildung 19*).



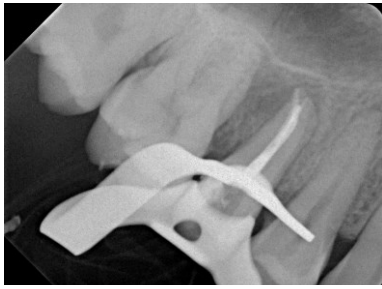
Abbildung 14:
Diagnoseaufnahme



Abbildung 15:
Röntgenmess-
aufnahme



Abbildung 16:
Masterpointaufnahme



*Abbildung 17: Kontrolle
der Wurzelfüllung*



*Abbildung 18:
6-Monats-Recall*



*Abbildung 19:
12-Monats-Recall*

4.3.2 Fall 2

Es handelte sich hierbei um eine 41-jährige Patientin, welche sich mit Schmerzen in der Ambulanz der Abteilung Zahnerhaltung und Parodontologie der Universität München vorstellte. Bei der Untersuchung fanden wir am Zahn 12 einen positiven Perkussionstest und einen negativen Sensibilitätstest (Kältetest). Es wurden keine Schwellung, kein apikaler Druckschmerz, keine Fistel und kein Abszess festgestellt. Ebenso wurde keine Lockerung, aber 4 mm Taschen am Zahn 12 und an seinen Nachbarzähnen gefunden. Der Zahn war mit einer augenscheinlich intakten mit den Nachbarzähnen verbockten Krone versorgt. Nach der eingehenden klinischen Untersuchung folgte die röntgenologische. Hierzu wurde ein Röntgenbild von der apikalen Region des 12 erstellt (*Abbildung 20*). Zu sehen war eine gut abgrenzbare periapikale Osteolyse (PAI = 4) mit einem Durchmesser > 5 mm. Die Patientin wurde nach dem Ozonprotokoll behandelt. Nachfolgend sind die während der Wurzelkanalbehandlung entstandene Röntgenmessaufnahme (*Abbildung 21*), Masterpointaufnahme (*Abbildung 22*) und Kontrollaufnahme der fertigen Wurzelkanalfüllung (*Abbildung 23*) dargestellt.

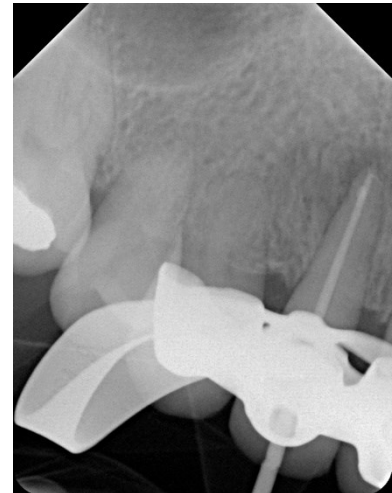
Nach 6 Monaten konnten wir nur noch eine geringgradige Veränderung der Knochenstruktur (PAI = 2) mit einem Durchmesser zwischen 2-5 mm diagnostizieren (*Abbildung 24*). Nach 12 Monaten diagnostizierten wir Normalbefund (*Abbildung 25*).



*Abbildung 20:
Diagnoseaufnahme*



*Abbildung 21:
Röntgenmessaufnahme*



*Abbildung 22:
Masterpointaufnahme*



*Abbildung 23: Kontrolle
der Wurzelfüllung*



*Abbildung 24:
6-Monats-Recall*



*Abbildung 25:
12-Monats-Recall*

5 Diskussion

5.1 Klinische und röntgenologische Methoden und Ergebnisse

Bei der Untersuchung von Ozongas, als mögliches Desinfektionsmittel in der Behandlung der apikalen Parodontitis, wurden die in der Literatur empfohlenen Desinfektionszeiten von NaOCl und Ozon verglichen. Für eine 6 % NaOCl-Lösung wurde eine Kontaktzeit von 15 min und für Ozon eine Desinfektionszeit von 60 s pro Kanal ermittelt (Clegg *et al.*, 2006; Huth *et al.*, 2009). Aufgrund des Mangels an klinischen Studien für den Einsatz von Ozongas, mit der Konzentration von 32 g/m³, in der Behandlung von apikaler Parodontitis und der nicht unmittelbaren Übertragbarkeit von *in vitro* auf *in vivo* Studien, wurden 120 s Kontaktzeit pro Kanal gewählt. Die Desinfektionszeit für NaOCl blieb immer bei 15 min, da die Kanäle während des Spülvorgangs alle immer mit NaOCl gefüllt und somit in Kontakt waren. So standen im besten Fall 2 min 15 min bei einem Kanal und im schlechtesten Fall 8 min 15 min bei vier Kanälen gegenüber. Dem zeitlichen Vorteil stehen allerdings die hohen Anschaffungskosten des verwendeten Ozongerätes von fast 10.000 € gegenüber.

In dieser Studie wurde für die Behandlung der apikalen Parodontitiden ein zweizeitiges Vorgehen gewählt, das heißt die Trepanation und Aufbereitung der Kanäle wurden getrennt von der Wurzelkanalfüllung in zwei separaten Sitzungen gemacht. Klinische Studien konnten keinen signifikanten Vorteil für ein zweizeitiges Vorgehen gegenüber einem einzeitigen Vorgehen in der Behandlung von apikaler Parodontitis hinsichtlich der röntgenologischen Heilung belegen (Trope *et al.*, 1999; Weiger *et al.*, 2000; Dorasani *et al.*, 2013). Auch in Bezug auf eine weitere Reduktion der Bakterienlast konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Xavier *et al.*, 2013). Allerdings war Ca(OH)₂ in der Verringerung bakterieller Endotoxine sehr effizient. Aus diesem Grund fiel die Entscheidung auf ein zweizeitiges Vorgehen mit Ca(OH)₂ als einwöchige Medikamenteneinlage. In Kapitel 5.2 wird nochmal genauer auf die antimikrobielle Wirkung von Ca(OH)₂ eingegangen.

Die Zugangskavität wurde in dieser Studie mit einem selbstätzenden Dentinadhäsiv und Komposit verschlossen. Hier ist besonders wichtig zu erwähnen, dass Ozongas keinen negativen Effekt auf den Klebeverbund verschiedener Dentinadhäsive und die Mikrohärtigkeit von Dentin hat (Magni *et al.*, 2008; Magni *et al.*, 2009). Für NaOCl

existieren widersprüchliche Ergebnisse, der Einfluss auf Dentinadhäsive hängt hier stark vom verwendeten Spülprotokoll und der Konzentration von NaOCl ab (Ozturk und Özer 2004; Bitter *et al.*, 2013). Allerdings hat NaOCl einen signifikanten negativen Einfluss auf die Mirkohärte von Dentin (Fuentes *et al.*, 2004). Dies wirkt sich möglicherweise später negativ auf nötige Restaurationen oder Glasfaserstifte aus.

Bei dem Vergleich der klinischen Ergebnisse wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden. Die Patienten waren nach 6 und 12 Monaten beschwerdefrei, einzig in der Ozongruppe wurde nach 6 Monaten eine Fistel und in der Kontrollgruppe ein positiver Perkussionstest beobachtet.

Nach der Betrachtung klinisch relevanter Punkte wollen wir unseren Blick auf die röntgenologischen Ergebnisse richten. Der Schweregrad der apikalen Entzündungen war in etwa gleich auf die beiden Gruppen verteilt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, aber tendenziell waren mehrere schwere Fälle in der Ozongruppe zu finden (PAI 4 in 16 Fällen in der Ozongruppe, 12 in der NaOCl Gruppe). Nach 6 und 12 Monaten konnten zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede der PAI Werte gefunden werden. Allerdings war der durchschnittliche PAI Wert in der Ozongruppe geringer als in der Kontrollgruppe und das obwohl, wie schon oben erwähnt, tendenziell mehr schwerere Fälle in der Ozongruppe waren. Diese Beobachtung ist möglicherweise ein Hinweis darauf, dass Ozon den initialen Heilungsverlauf positiv beeinflusst. Dies wurde bereits in einem Tierversuch beobachtet, welcher die Einheilung eines autologen Knochentransplantates in die Schädelkalotte unter Ozongastherapie untersuchte (Ozdemir *et al.*, 2013). Die Knochenheilung war in dieser Studie unter Ozongastherapie signifikant besser.

Bei weiterer Betrachtung der Daten fällt auf, dass nach 12 Monaten nicht in allen Fällen eine komplette Ausheilung im Sinne von röntgenologischem Normalbefund stattgefunden hat. Hierfür wäre ein längerer Nachuntersuchungszeitraum notwendig. Dies wurde auch schon in anderen Studien beobachtet und diskutiert (Dorasani *et al.*, 2013). Studien mit längeren Nachuntersuchungszeiträumen zeigten ebenfalls, dass nach einem Jahr der Heilungsprozess nicht in allen Fällen abgeschlossen ist und darüber hinaus der Heilungsprozess weiter voranschreitet (Weiger *et al.*, 2000; Peters und Wesselink 2002).

Unsere Recallquoten mit 87 % (Ozon) und 73 % (NaOCl) nach 6 Monaten und 70 % (Ozon) bzw. 73% (NaOCl) nach 12 Monaten waren nicht sonderlich hoch. Neben einigen wenigen Fällen, in denen Patienten unbekannt verzogen und somit nicht mehr erreichbar waren, lag die geringe Recallquote überwiegend an mangelnder Compliance. Bei einem längeren Nachuntersuchungszeitraum wäre sicherlich mit weiteren Ausfällen zu rechnen gewesen, so dass für aussagekräftige Ergebnisse eine von Beginn an größere Patientengruppe hätte behandelt werden müssen. In klinischen Studien anderer Autoren, welche sich mit der Behandlung apikaler Parodontitis beschäftigt haben, lag die Recallquote zum Teil in der Größenordnung unserer Ergebnisse (18 Ausfälle bei 64 Patienten nach 12 Monate, Dorasani *et al.*, 2013), häufig jedoch höher bis hin zu 100 % und das obwohl sich der Beobachtungszeitraum teilweise über 5 Jahre erstreckte (Weiger *et al.*, 2000; Peters und Wesselink 2002; Molander *et al.*, 2007; Paredes-Vieyra und Enriquez, 2012). Leider geht aus den Publikationen der anderen Autoren nicht hervor worauf die wünschenswert hohe Recallquote zurückzuführen ist.

5.2 Mikrobiologische Methoden und Ergebnisse

Die Bakterienidentifikationen wurden mittels MALDI/TOF-MS durchgeführt. Dies ist ein zuverlässiges, zeit- und kostengünstiges Verfahren (Bizzini und Greub, 2010). Durch die Notwendigkeit einer Kultur, ist zusätzlich zur Speziesidentifikation auch eine Quantifizierung der Bakterien möglich. Nicht kultivierbare Mikroorganismen können mit dieser Methode nicht detektiert werden. Im Gegensatz zur Identifizierung mit Bunter Reihe benötigt MALDI/TOF-MS keinen zusätzlichen Inkubationsschritt für die biochemischen Reaktionen. Ein weiteres Problem bei der Nutzung der Buntten Reihe ist, dass viele Anaerobier, wie wir sie im Bereich der Endodontie erwarten, ähnliches biochemisches Verhalten zeigen und daraus zum Teil unsichere Identifizierungsergebnisse resultieren (Hanson *et al.*, 1979, Summanen und Jousimies-Somer, 1988). Ähnlich arbeitsintensiv ist die Identifizierung mittels 16S rRNA Sequenzierung. In Fällen, in denen MALDI/TOF-MS keine brauchbaren Ergebnisse lieferte, kam diese Technik zur Anwendung. Andere Autoren verwendeten zur Identifizierung von Bakterien der Wurzelkanalflora Checkerboard DNA-DNA Hybridisierung (Siqueira und Rôças, 2009). Mit dieser Methode lassen sich auch nichtkultivierbare Bakterien nachweisen und dadurch, dass keine Kultur

notwendig ist, ist diese Methode auch recht schnell. Ein Nachteil allerdings ist, es lassen sich nur Bakterien mittels speziellen Gensonden nachweisen, die auch vermutet werden und es ist nur eine semi-quantitative Auswertung der Bakterienlast möglich (Socransky *et al.*, 1994).

Die in dieser Untersuchung am häufigsten aufgetretenen Genera waren *Streptococcus spp.*, gefolgt von *Parvimonas spp.* und *Prevotella spp.*. Ähnliche Keimspektren wurden auch bei anderen Untersuchungen gefunden (Siqueira *et al.*, 2009; Rôças und Siqueira, 2011). Die Häufigkeit mit der einzelne Keime vorkamen war zum Teil eine Andere und zum Teil wurden auch Bakterien identifiziert wie z.B. *Treponema spp.*, welche in unserer Analyse nicht vorkamen. Verantwortlich dafür sind wahrscheinlich die Keimvielfalt endodontologischer Infektionen, unterschiedliche Patientenpools und nicht zuletzt auch unterschiedliche Methoden der Bakterienidentifizierung. In den zwei genannten Studien wurde die Bakterienidentifizierung mittels Checkerboard-Assay, einer kulturunabhängigen Methode, durchgeführt.

Interessanterweise war in der Ozongruppe in der Probe 4, also nach der Medikamenteneinlage, die Anzahl der Streptokokken im Vergleich zu der postchemischen Probe wieder angestiegen, während alle anderen Bakterien in der Zeit der Medikamenteneinlage weiter zurück gingen. In der NaOCl Gruppe war dies nicht zu beobachten. Dort nahm die Anzahl aller Bakterien weiter ab (Grafik 4). Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass Streptokokken weniger sensitiv gegenüber Ozon sind. Sie sind nur fakultativ anaerob und zeigen auch in Anwesenheit von Sauerstoff ein gutes Wachstum. Allerdings sind in der Literatur bisher keine ähnlichen Beobachtungen beschrieben oder Belege zu finden, die diese Erklärung stützen oder ihr entgegen treten. Andere Gründe könnten sein, dass die Inaktivierung von NaOCl ineffektiv war und dadurch eine nachhaltigere Wirkung eintritt oder eine ineffektive Applikation der Medikamenteneinlage in einigen Zähnen der Ozongruppe.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass sich die Ausgangsbedingungen in beiden Versuchsgruppen sowohl mikrobiologisch als auch röntgenologisch nicht signifikant voneinander unterscheiden haben (Mann-Whitney-U Test). Um den zusätzlichen, möglicherweise unterschiedlich starken, Effekt der Desinfektionsmittel auf die Bakterienreduktion im Vergleich zur Bakterienreduktion durch die mechanische Aufbereitung der Wurzelkanäle herauszuarbeiten wurden die Ergebnisse getrennt

betrachtet. Nach mechanischer Aufbereitung hatten wir in der Ozongruppe eine Bakterienreduktion von 99,31 % (Median) und in der NaOCl Gruppe von 98,45 %. Dieses Ergebnis stützt frühere Studien, die die Wichtigkeit einer suffizienten mechanischen Aufbereitung nachgewiesen haben (Bystrom und Sundqvist, 1981; Dalton *et al.*, 1998; Siqueira *et al.*, 1999; Shuping *et al.*, 2000). Durch die darauf folgende Desinfektion der Wurzelkanäle stieg die Bakterienreduktion in der Ozongruppe auf 99,98 % (Median) und 100 % in der NaOCl Gruppe an. Dieser feine Unterschied zwischen den Gruppen war nicht signifikant.

Betrachten wir die Wirkung der Medikamenteneinlage genauer, dann ist festzustellen, dass in der Mehrheit der Fälle die Bakterienlast weiter abnimmt. In einigen Fällen steigt diese aber auch wieder an oder bleibt gleich. In der Summe jedoch war eine Zunahme der Fälle zu verzeichnen, in denen keine Bakterien mehr nachgewiesen werden konnten. Diese gegenteiligen Beobachtungen wurden schon vermehrt beschrieben (Peters und Wesselink 2002; Kim und Kim 2014). Bezüglich der Frage, ob nun verbleibende Bakterien einen Einfluss auf den klinischen bzw. röntgenologischen Erfolg haben, konnte kein signifikanter Einfluss festgestellt werden.

5.3 Aussagekraft und Limitierung

Als mögliche Limitierung der Aussagekraft dieser Studie hinsichtlich der Erfolgs- und Misserfolgsrate bzw. der röntgenologischen Auswertung, mittels PAI und Größe der Läsion, müssen die relativ schlechten Ergebnisse der Inter- und Intrarater-Reliabilität (0,54-0,63 für den PAI und 0,57-0,67 für die Größe der apikalen Läsion) angesehen werden und das obwohl die Untersucher vorher trainiert wurden. Relativ ähnliche Ergebnisse wie in unserer Studie, wurden auch in einer anderen Studie erzielt, die die Ergebnisse von Wurzelkanalbehandlungen vergleicht, welche in einer oder mehreren Sitzungen durchgeführt wurden (Trope *et al.*, 1999). Hierbei befundeten acht verschiedene Zahnärzte Röntgenbilder mit apikaler Parodontitis. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Beurteilung des Schweregrades einer apikalen Läsion nach Kategorien (PAI und Größe der apikalen Läsion) erfolgt. Im Gegensatz zur Einteilung der Größe der apikalen Läsion beruht die Kategorisierung des PAI auf keinen Messwerten, es handelt sich um eine reine Bildinterpretation nach Definitionen, welche einen gewissen Interpretationsspielraum lassen. Auch die

Messung des größten Durchmessers der apikalen Läsion ist auf den Röntgenbildern nicht immer einfach durchzuführen, da die Übergänge zwischen der apikalen Osteolyse zum gesunden Knochen fließend sind. Dessen ungeachtet ist der PAI in der Beurteilung des röntgenologischen Heilungsprozesses bei klinischen Studien in der Endodontie ein häufig verwendetes Werkzeug (Trope *et al.*, 1999; Peter und Wesselink, 2002; Waltimo *et al.*, 2005; Penesis *et al.*, 2008; Paredes-Vieyra und Enriquez, 2012; Dorasani *et al.*, 2013). Bei abweichenden Bewertungen der Röntgenbilder wurde durch Konsensbildung der zwei Untersucher, versucht das Problem zu minimieren.

6 Schlussfolgerung

Aus unseren Ergebnissen kann man schließen, dass das verwendete Desinfektionsprotokoll mit Ozongas in der Behandlung von apikaler Parodontitis im Hinblick auf das mikrobiologische, röntgenologische und klinische Ergebnis genauso effektiv war wie das verwendete NaOCl Protokoll.

Unter den Aspekten der sicheren Handhabung von Ozon, dem zeitlichen Vorteil, der nicht negativen Beeinflussung der Mikrohärtigkeit des Dentins und des Haftverbundes mit Dentinadhäsiven ist ein vermehrter Einsatz im Bereich der Endodontie denkbar.

7 Zusammenfassung

In Deutschland werden jedes Jahr über 7 Millionen Wurzelkanalbehandlungen durchgeführt. Die Erfolgsrate liegt dabei aber gerade mal zwischen 68-86 % bei Zähnen mit apikaler Parodontitis. Die möglichst vollständige Bakterienreduktion stellt ein zentrales Ziel der Behandlung dar. In Studien konnte die Erfolgsrate auf über 90 % gesteigert werden, wenn zum Zeitpunkt der Wurzelkanalfüllung keine Bakterien im Wurzelkanal mehr nachweisbar waren. Seit langem wird NaOCl als Desinfektionsmittel in der Endodontie eingesetzt. Der Umgang mit NaOCl ist nicht ganz unkritisch, z.B. wird immer wieder von Spülunfällen im Umgang mit NaOCl berichtet. Neue, sicherere Desinfektionsmittel könnten zur Steigerung der Erfolgsrate von Wurzelkanalbehandlungen beitragen.

Ziel der Arbeit war die Untersuchung der Effektivität eines auf Ozongas basierenden Desinfektionsprotokolls im Vergleich zu einem auf NaOCl basierenden Desinfektionsprotokolls in der Behandlung von apikaler Parodontitis.

In dieser prospektiven, randomisierten, kontrollierten Einfachblindstudie wurden 60 bleibende Zähne von 57 Patienten aufgenommen und willkürlich einer Versuchsgruppe zugewiesen. Im Rahmen der Eingangsuntersuchungen wurden die klinischen Symptome, der Wert des PAI und die Größe der apikalen Läsion erhoben. In beiden Gruppen wurden die Wurzelkanäle unter Verwendung eines maschinellen Aufbereitungssystems mit Feilen erweitert und mit NaCl und EDTA gespült. Als Desinfektionsmittel kam nun entweder Ozongas (32 g/m^3) oder NaOCl (3 %) zum Einsatz. Anschließend wurde Ca(OH)_2 als Medikament in den Kanal appliziert und für eine Woche belassen. Zur Entfernung der einwöchigen Medikamenteneinlage wurden die Wurzelkanäle erneut mit NaCl gespült und vor der endgültigen Wurzelkanalfüllung mit Ozongas in der Ozongruppe und mit CHX (2 %) in der NaOCl Gruppe desinfiziert. Im Laufe der Behandlung wurde nach der Präparation der Zugangskavität, nach der mechanischen Aufbereitung/Reinigung, nach der Desinfektion und nach einwöchiger Medikamenteneinlage jeweils eine mikrobiologische Probe entnommen. Die Bakterienidentifizierung wurde mittels MALDI-TOF MS durchgeführt. In Fällen, in denen MALDI-TOF MS keine verwertbaren Resultate lieferte, wurde zusätzlich eine 16S rRNA Gensequenzierung durchgeführt.

Die Zähne wurden nach 6 und nach 12 Monaten verblindet nachuntersucht. Basierend auf den Ergebnissen wurden dann die Erfolgsraten für beide Gruppen berechnet und miteinander verglichen. Ebenso folgten ein Vergleich des röntgenologischen Heilungsverlaufes unter Zuhilfenahme des PAI und der Größe der apikalen Läsion sowie ein Vergleich der Bakterienreduktion (Exakter Fischer Test, Mann-Whitney-U Test).

Ein Vergleich der Erfolgsraten lieferte kein signifikantes Ergebnis (Ozongruppe: 96,2 % nach 6, 95,5 % nach 12 Monate; NaOCl Gruppe: 95,5 % nach 6, 95,2 % nach 12 Monate). Ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich war der röntgenologische Heilungsverlauf, d.h. die Abnahme der PAI Werte und die Größe der apikalen Läsion nach 6 und 12 Monaten. Die Bakterienreduktionen zwischen den Gruppen nach der mechanischen Aufbereitung, nach der chemischen Desinfektion der Wurzelkanäle und nach der Medikamenteneinlage waren ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich. Die am häufigsten beobachteten Bakteriengenera waren Streptokokken, Parvimonas und Prevotella.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Studie kann man schließen, dass das verwendete Ozongas-Desinfektionsprotokoll in der Behandlung von apikaler Parodontitis im Hinblick auf das mikrobiologische, röntgenologische und klinische Ergebnis genauso effektiv ist wie das verwendete NaOCl-Protokoll.

Diese Studie wurde durch die European Society of Endodontology im Rahmen des Annual Research Grant mit 12.000 € gefördert.

Diese Arbeit wurde zur Publikation im Journal Clinical Oral Investigations mit einem Impact Factor von 2,352 (Stand 2014) eingereicht.

8 Literaturverzeichnis

- Abd Elhamid M, Mosallam R (2010). Effect of bleaching versus repolishing on colour and surface topography of stained resin composite. *Aust Dent J* 55 (4): 390-398.
- American Association of Endodontics (2015). AAE Clinical Considerations for a Regenerative Procedure, Revised 4-12-15. URL: http://www.aae.org/uploadedfiles/publications_and_research/research/currentregenerativeendodonticconsiderations.pdf - Download am 12.06.2015
- Ari H, Yaşar E, Belli S (2003). Effects of NaOCl on Bond Strengths of Resin Cements to Root Canal Dentin. *J Endod* 29 (4): 248-251.
- Atabek D, Oztas N (2011). Effectiveness of Ozone with or without the Additional Use of Remineralizing Solution on Non-Cavitated Fissure Carious Lesions in Permanent Molars. *Eur J Dent* 5 (4): 393-399.
- Aykut-Yetkiner A, Eden E, Ertuğrul F, Ergin E, Ateş M (2013). Antibacterial efficacy of prophylactic ozone treatment on patients with fixed orthodontic appliances. *Acta Odontol Scand* 71 (6): 1620-1624.
- Azarpazhooh A, Limeback H (2008). The application of ozone in dentistry: A systematic review of literature. *J Dent* 36 (2): 104-116.
- Behrends JC, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S, Grissmer S, Hoth M, Kurtz A, Leipziger J, Müller F, Pedain C, Rettig J, Wagner C, Wischmeyer E (2010). *Duale Reihe Physiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 193-222.
- Bergenholtz G (1977). Effect of bacterial products on inflammatory reactions in the dental pulp. *Scand J Dent Res* 85 (2): 122-129.
- Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR (1986). Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature* 319 (6053): 516-518.
- Bitter K, Hambarayan A, Neumann K, Blunck U, Sterzenbach G (2013). Various irrigation protocols for final rinse to improve bond strengths of fiber posts inside the root canal. *Eur J Oral Sci* 121 (4): 349–354.
- Bitter K, Noetzel J, Volk C, Neumann K, Kielbassa AM (2008). Bond Strength of Fiber Posts after the Application of Erbium: Yttrium-Aluminum-Garnet Laser Treatment and Gaseous Ozone to the Root Canal. *J Endod* 34 (3) 306-309.

- Bizzini A, Greub G (2010). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin Microbiol Infect* 16 (11):1614-1619.
- Browne RM (1975). The pathogenesis of odontogenic cysts: a review. *J Oral Pathol* 4 (1): 31-46.
- Bystrom A, Sundqvist G (1981). Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res* 89 (4): 321-328.
- Cadenaro M, Delise C, Antoniello F, Navarra OC, Di Lenarda R, Breschi L (2009). Enamel and dentin bond strength following gaseous ozone application. *J Adhes Dent* 11 (4): 287-292.
- Case PD, Bird PS, Kahler WA, George R, Walsh LJ (2012). Treatment of root canal biofilms of *Enterococcus faecalis* with ozonegas and passive ultrasound activation. *J Endod* 38 (4): 523-526.
- Cavalcanti BN, Zeitlin BD, Nör JE (2013). A hydrogel scaffold that maintains viability and supports differentiation of dental pulp stem cells. *Dent Mater* 29 (1): 97-102.
- Cehreli SB, Guzey A, Arhun N, Cetinsahin A, Unver B (2010). The effects of prophylactic ozone pretreatment of enamel on shear bond strength of orthodontic brackets bonded with total or self-etch adhesive systems. *Eur J Dent* 4 (4): 367-373.
- César J, Sumita TC, Junqueira JC, Jorge AO, do Rego MA (2012). Antimicrobial effects of ozonated water on the sanitization of dental instruments contaminated with *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, or the spores of *B. atrophaeus*. *J Infect Public Health* 5 (4): 269-274.
- Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR (2006). The Effect of Exposure to Irrigant Solutions on Apical Dentin Biofilms In Vitro. *J Endod* 32 (5): 434-437.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2008) CLSI. Interpretive Criteria for Identification of Bacteria and Fungi by DNA Target Sequencing; Approved Guideline. CLSI document MM18-A. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute
- Cohen J (1960). A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological Measurement* 20: 37-46.

- Dalkilic EE1, Arisu HD, Kivanc BH, Uctasli MB, Omurlu H (2012). Effect of different disinfectant methods on the initial microtensile bond strength of a self-etch adhesive to dentin. *Lasers Med Sci* 27 (4): 819-25.
- Dalton BC, Ørstavik D, Phillips C, Pettiette M, Trope M (1998). Bacterial reduction with nickel-titanium rotary instrumentation. *J Endod* 24 (11): 763-767.
- Dhingra K, Vandana KL (2011). Management of gingival inflammation in orthodontic patients with ozonated water irrigation-a pilot study. *Int J Dent Hyg* 9 (4): 296-302.
- Di Lenarda R, Cadenaro M, Sbaizero O (2000). Effectiveness of 1 mol L⁻¹ citric acid and 15% EDTA irrigation on smear layer removal. *Int Endod J* 33 (1): 46-52.
- Dorasani G, Madhusudhana K, Chinni SK (2013). Clinical and radiographic evaluation of single-visit and multi-visit endodontic treatment of teeth with periapical pathology: An in vivo study. *J Conserv Dent* 16 (6): 484-488.
- Downes J, Mangels JI, Holden J, Ferraro MJ, Baron EJ (1990). Evaluation of two single-plate incubation systems and the anaerobic chamber for the cultivation of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol* 28 (2): 246-248.
- Drevinek M, Dresler J, Klimentova J, Pisa L, Hubalek M (2012). Evaluation of sample preparation methods for MALDI-TOF MS identification of highly dangerous bacteria. *Lett Appl Microbiol* 55 (1) 40-46.
- Dupont WD, Plummer WD Jr. (1990). Power and sample size calculations. A review and computer program. *Control Clin Trials* 11 (2): 116-128.
- Estrela C, Bammann LL, Pimenta FC, Pécora JD (2001). Control of microorganisms in vitro by calcium hydroxide pastes. *Int Endod J* 34 (5): 341-345.
- Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spanó JC, Marchesan MA, Pécora JD (2002). Mechanism of Action of Sodium Hypochlorite. *Braz Dent J* 13 (2): 113-117
- Fabricius L, Dahlén G, Holm SE, Möller AJ (1982). Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scand J Dent Res* 90 (3): 200-206.
- Fabricius L, Dahlén G, Sundqvist G, Happonen RP, Möller AJ (2006). Influence of residual bacteria on periapical tissue healing after chemomechanical treatment and root filling of experimentally infected monkey teeth. *Eur J Oral Sci* 114 (4): 278-285.
- Fisch EA (1936a). Über Ozonbehandlung in der Zahnheilkunde. *Zahnärztl Rundsch* 45: 952-958.

- Fisch EA (1936b). Über Anwendung von Ozon in der Stomatologie, als wirksames Mittel einer neuzeitlichen Therapie. *Dtsch Zahnärztl Wschr* 40/41: 943-946 u. 971-974.
- Frascino AV, Mantesso A, Corrêa L, Deboni MC (2013). Aqueous-ozone irrigation of bone monocortical wounds in hyperglycaemic rats. *Acta Cir Bras* 28 (5): 327-333.
- Fuentes V, Ceballos L, Osorio R, Toledano M, Carvalho RM, Pashley DH (2004). Tensile strength and microhardness of treated human dentin. *Dent Mater* 20 (6): 522-529.
- Galler KM, D'Souza RN, Federlin M, Cavender AC, Hartgerink JD, Hecker S, Schmalz G (2011b). Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. *J Endod* 37 (11): 1536-1541.
- Galler KM, D'Souza RN, Hartgerink JD, Schmalz G (2011a). Scaffolds for dental pulp tissue engineering. *AdvDent Res* 23 (3): 333-339.
- Garcia EJ, Serrano AP, Urruchi WI, Deboni MC, Reis A, Grande RH, Loguercio AD (2012). Influence of ozonegas and ozonated water application to dentin and bonded interfaces on resin-dentin bond strength. *J Adhes Dent* 14 (4): 363-370.
- Gençoğlu N, Oruçoğlu H, Helvacioğlu D (2007). Apical leakage of different gutta-percha techniques: thermafil, js quick-fill, soft core, microseal, system B and lateral condensation with a computerized fluid filtration meter. *Eur J Dent* 1 (2): 97-103.
- Gernhardt CR, Eppendorf K, Kozlowski A, Brandt M (2004). Toxicity of concentrated sodium hypochlorite used as an endodontic irrigant. *Int Endod J* 37 (4): 272-280.
- Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ (2001). In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 34 (6): 424-428.
- Goswami M, Chhabra N, Kumar G, Verma M, Chhabra A (2014). Sodium hypochlorite dental accidents. *Paediatr Int Child Health* 34 (1): 66-69.
- Halbauer K, Prskalo K, Janković B, Tarle Z, Pandurić V, Kalenić S (2013). Efficacy of ozone on microorganisms in the tooth root canal. *Coll Antropol* 37 (1): 101-107.

- Hanson CW, Cassorla R, Martin WJ (1979). API and Minitex systems in identification of clinical isolates of anaerobic gram-negative bacilli and *Clostridium* species. *J Clin Microbiol* 10 (1): 14–18.
- Hauser-Gerspach I, Pfäffli-Savtchenko V, Dähnhardt JE, Meyer J, Lussi A (2009). Comparison of the immediate effects of gaseous ozone and chlorhexidine gel on bacteria in cavitated carious lesions in children in vivo. *Clin Oral Investig* 13 (3): 287-291.
- Hauser-Gerspach I, Vadaszan J, Deronjic I, Gass C, Meyer J, Dard M, Waltimo T, Stübinger S, Mauth C (2012). Influence of gaseous ozone in peri-implantitis: bactericidal efficacy and cellular response. An in vitro study using titanium and zirconia. *Clin Oral Investig* 16 (4): 1049-1059.
- Herrera DR, Santos ZT, Tay LY, Silva EJ, Loguercio AD, Gomes BP (2013). Efficacy of different final irrigant activation protocols on smear layer removal by EDTA and citric acid. *Microsc Res Tech* 76 (4): 364-369
- Herrera DR, Santos ZT, Tay LY, Silva EJ, Loguercio AD, Gomes BP (2013). Efficacy of different final irrigant activation protocols on smear layer removal by EDTA and citric acid. *Microsc Res Tech* 76 (4): 364-369.
- Hülsmann M, Hahn W (2000). Complications during root canal irrigation – literature review and case reports. *Int Endod J* 33 (3): 186-193.
- Hülsmann M, Heppeler J (2008). Epidemiologische Aspekte der Parodontitis apicalis. *Endodontie* 17 (1): 19-21.
- Hülsmann M, Schäfer E (2007). „Good clinical practice“. Die Wurzelkanalbehandlung Stellungnahme des Endodontie-Beirats der DGZ. URL: http://www.dgzmk.de/uploads/tx_szdgzmkdocuments/Good_clinical_practice:_Die_Wurzelkanalbehandlung.pdf - Download am 12.06.2015
- Huth KC, Jakob FM, Saugel B, Cappello C, Paschos E, Hollweck R, Hickel R, Brand K (2006). Effect of ozone on oral cells compared with established antimicrobials. *Eur J Oral Sci* 114 (5): 435-440.
- Huth KC, Quirling M, Lenzke S, Paschos E, Kamereck K, Brand K, Hickel R, Ilie N (2011). Effectiveness of ozone against periodontal pathogenic microorganisms. *Eur J Oral Sci* 19 (3): 204-210.
- Huth KC, Quirling M, Maier S, Kamereck K, Alkhayer M, Paschos E, Welsch U, Miethke T, Brand K, Hickel R (2009). Effectiveness of ozone against

- endodontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model. *Int Endod J* 42 (1): 3-13.
- Hyman JJ, Cohen ME (1984). The predictive value of endodontic diagnostic tests. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 58 (3): 343-346.
- Ingram TA 3rd (1990). Response of the Human Eye to Accidental Exposure to Sodium Hypochlorite . *J Endod* 16 (5): 235-238.
- Micheelis W, Schiffner U (2006). Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV). Köln: Deutscher Zahnärzte Verlag DÄV GmbH
- Jorge EG, Tanomaru-Filho M, Gonçalves M, Tanomaru JM (2008). Detection of periapical lesion development by conventional radiography or computed tomography. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 106 (1): 56-61
- Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ (1965). The effects of surgical exposures of dental pulps in germ- free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 20 (3): 340-349.
- Kazancioglu HO, Ezirganli S, Demirtas N (2014). Comparison of the influence of ozone and laser therapies on pain, swelling, and trismus following impacted third-molar surgery. *Lasers Med Sci* 29 (4): 1313-1319.
- Kim D, Kim E (2014). Antimicrobial effect of calcium hydroxide as an intracanal medicament in root canal treatment: a literature review - Part I. In vitro studies. *Restor Dent Endod* 39 (4): 241–252.
- Kim J, Yang J, Park OJ, Kang SS, Kim WS, Kurokawa K, Yun CH, Kim HH, Lee BL, Han SH (2013). Lipoproteins are an important bacterial component responsible for bone destruction through the induction of osteoclast differentiation and activation. *J Bone Miner Res* 28 (11): 2381-2391.
- Kıvanç BH, Arisu HD, Özcan S, Görgül G, Alaçam T (2010). The effect of the application of gaseous ozone and ND:YAG laser on glass-fibre post bond strength. *Aust Endod J* 38 (3):118-123.
- Klein DC, Raisz LG. (1970). Prostaglandins: stimulation of bone resorption in tissue culture. *Endocrinology* 86 (6): 1436-1440.
- Klimm W (2011). Endodontologie, Lehrbuch für Studium und Beruf. Köln: Deutscher Zahnärzte Verlag, 155-214.
- Knight GM, McIntyre JM, Craig GG, Mulyani, Zilm PS (2008). The inability of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus* to form a biofilm in vitro on dentine pretreated with ozone. *Aust Dent J* 53 (4): 349-353.

- Knutsson G, Jontell M, Bergenholtz G (1994). Determination of plasma proteins in dentinal fluid from cavities prepared in healthy young human teeth. *Arch Oral Biol* 39 (3): 185-190.
- Komanapalli IR, Lau BH (1996). Ozone-induced damage of Escherichia coli K-12. *Appl Microbiol Biotechnol* 46 (5-6): 610-644.
- Komanapalli IR, Mudd JB, Lau BH (1997). Effect of ozone on metabolic activities of Escherichia coli K- 12. *Toxicol Lett* 90 (1): 61-66.
- Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R, McCabe S, Wong T, Campagnuolo G, Moran E, Bogoch ER, Van G, Nguyen LT, Ohashi PS, Lacey DL, Fish E, Boyle WJ, Penninger JM (1999). Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 402 (6759): 304-309.
- Kronenberg O, Lussi A, Ruf S (2009). Preventive effect of ozone on the development of white spot lesions during multibracket appliance therapy. *Angle Orthod* 79 (1): 64-69.
- Kuştarci A, Sümer Z, Altunbaş D, Koşum S (2009). Bactericidal effect of KTP laser irradiation against Enterococcus faecalis compared with gaseous ozone: an ex vivo study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 107 (5): 73-79.
- Kvist T, Molander A, Dahlén G, Reit C (2004). Microbiological evaluation of one- and two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a randomized, clinical trial. *J Endod* 30 (8): 572-576.
- Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ (1998). Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine that Regulates Osteoclast Differentiation and Activation. *Cell* 93 (2): 165-176.
- Langeland K, Rodrigues H, Dowden W (1974). Periodontal disease, bacteria, and pulpal histopathology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 37 (2): 257-270.
- Li D, Powers JM (1999). Bond strength of compomers with acidic primers to human enamel. *J Dent Res* 78, 445 (Abstr 2719).
- Liu Z, Jiang T, Wang Y, Wang X (2013). Fluocinolone acetonide promotes the proliferation and mineralization of dental pulp cells. *J Endod* 39 (2): 217-222.
- Love RM (1996). Bacterial penetration of the root canal of intact incisor teeth after a simulated traumatic injury. *Endod Dent Traumatol* 12 (6): 289-293.

- Lynch CD, Burke FM (2006). Quality of root canal fillings performed by undergraduate students on single-rooted teeth. *Eur J Dent Educ* 10 (2): 67-72.
- Lynch E (2004). Ozone: The Revolution in Dentistry. London: Quintessence Publishing Co. Ltd., 15-22.
- Magni E, Ferrari M, Hickel R, Huth KC, Ilie N (2008). Effect of ozone gas application on the mechanical properties of dental adhesives bonded to dentin. *Dental Materials* 24 (10) 1428–1434
- Magni E, Ferrari M, Papacchini F, Hickel R, Ilie N (2011). Influence of ozone on the composite-to-composite bond. *Clin Oral Invest* 15 (2) 249–256
- Magni E, Hickel R, Ilie N (2009). Influence of gasiform ozone on the micromechanical properties of dentin. *Int Dent South Africa* 11 (5): 16-21.
- Marklein G, Josten M, Klanke U, Müller E, Horré R, Maier T, Wenzel T, Kostrzewa M, Bierbaum G, Hoerauf A, Sahl HG (2009). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol* 47 (9) 2912-2917.
- Mathieu S, Jeanneau C, Sheibat-Othman N, Kalaji N, Fessi H, About I (2013). Usefulness of controlled release of growth factors in investigating the early events of dentin-pulp regeneration. *J Endod* 39 (2): 228-235.
- McGurkin-Smith R, Trope M, Caplan D, Sigurdsson A (2005). Reduction of intracanal bacteria using GT rotary instrumentation, 5.25% NaOCl, EDTA, and Ca(OH)₂. *J Endod* 31 (5): 359-363.
- Millar BJ, Hodson N (2007). Assessment of the safety of two ozone delivery devices. *J Dent* 35 (3): 195-200.
- Miller WD (1894). An Introduction of the study of the bacterio-pathology of the dental pulp. *Dent Cosmos* 36 (7): 505-528.
- Mohammadi Z, Shalavi S, Yazdizadeh M (2012). Antimicrobial Activity of Calcium Hydroxide in Endodontics: A Review. *Chonnam Med J* 48 (3): 133-140.
- Molander A, Warfvinge J, Reit C, Kvist T (2007). Clinical and radiographic evaluation of one- and two-visit endodontic treatment of asymptomatic necrotic teeth with apical periodontitis: a randomized clinical trial. *J Endod* 33 (10): 1145-1148.
- Möller AJ (1966). Microbial examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Odontol Tidskr* 74 (5): 1-380.

- Möller AJ, Fabricius L, Dahlén G, Ohman AE, Heyden G (1981). Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res* 89 (6): 475-484.
- Muzylak M, Arnett TR, Price JS, Horton MA (2007). The in vitro effect of pH on osteoclasts and bone resorption in the cat: implications for the pathogenesis of FORL. *J Cell Physiol* 213(1): 144-150.
- Naenni N, Thoma K, Zehnder M (2004). Soft Tissue Dissolution Capacity of Currently Used and Potential Endodontic Irrigants. *J Endod* 30 (11): 785-787
- Nagaoka S, Miyazaki Y, Liu HJ, Iwamoto Y, Kitano M, Kawagoe M (1995). Bacterial invasion into dentinal tubules of human vital and nonvital teeth. *J Endod* 21 (2): 70-73.
- Nguyen L, Dewhirst FE, Hauschka PV, Stashenko P (1991). Interleukin-1 beta stimulates bone resorption and inhibits bone formation in vivo. *Lymphokine Cytokine Res* 10 (1-2): 15-21
- Ohlmüller W (1893). Über die Einwirkung des Ozons auf Bakterien. In: Kaiserliches Gesundheitsamt Hrsg. Arbeiten aus dem kaiserlichen Gesundheitsamt. Berlin: Springer-Verlag: 229.
- Ørstavik D, Haapasalo M (1990). Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 6 (4): 142-149.
- Ørstavik D, Kerekes K, Eriksen HM (1986). The periapical index: A scoring system for radiographic assessment of apical periodontitis. *Dent Traumatol* 2 (1): 20-34.
- Ozdemir H, Toker H, Balcı H, Ozer H (2013). Effect of ozone therapy on autogenous bone graft healing in calvarial defects: a histologic and histometric study in rats. *J Periodontal Res* 48 (6): 722-726.
- Ozturk B, Özer F (2004). Effect of NaOCl on Bond Strengths of Bonding Agents to Pulp Chamber Lateral Walls. *J Endod* 30 (5): 362-365.
- Pappen FG, Qian W, Aleksejūniene J, Leonardo Rde T, Leonardo MR, Haapasalo M (2010). Inhibition of Sodium Hypochlorite Antimicrobial Activity in the Presence of Bovine Serum Albumin. *J Endod* 36 (2): 268-271.
- Paqué F, Sirtes G (2007). Apical sealing ability of Resilon/Epiphany versus gutta-percha/AH Plus: immediate and 16-months leakage. *Int Endod J* 40 (9): 722-729.

- Paredes-Vieyra J, Enriquez FJ (2012). Success rate of single- versus two-visit root canal treatment of teeth with apical periodontitis: a randomized controlled trial. *J Endod* 38 (9): 1164-1169.
- Paschoalino Mde A, Hanan AA, Marques AA, Garcia Lda F, Garrido AB, Sponchiado EC Jr (2012). Injection of sodium hypochlorite beyond the apical foramen—A case report. *Gen Dent* 60 (1): 16-19.
- Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, Pashley DH (1985). Cytotoxic Effects of NaOCl on vital tissue. *J Endod* 11 (12): 525-528.
- Patil S, Valdramidis VP, Karatzas KA, Cullen PJ, Bourke P (2011). Assessing the microbial oxidative stress mechanism of ozone treatment through the responses of *Escherichia coli* mutants. *J Appl Microbiol* 111 (1): 136-144.
- Patil SA, Dodwad PK, Patil AA (2013). An in vitro comparison of bond strengths of Gutta-percha/AH Plus, Resilon/Epiphany self-etch and EndoREZ obturation system to intraradicular dentin using a push-out test design. *J Conserv Dent* 16 (3): 238-242.
- Penesis VA, Fitzgerald PI, Fayad MI, Wenckus CS, Be Gole EA, Johnson BR (2008). Outcome of one-visit and two-visit endodontic treatment of necrotic teeth with apical periodontitis: a randomized controlled trial with one-year evaluation. *J Endod* 34 (3): 251-257.
- Peters LB, Wesselink PR (2002). Periapical healing of endodontically treated teeth in one and two visits obturated in the presence or absence of detectable microorganisms. *Int Endod J* 35 (8): 660-667.
- Peters OA, Schönenberger K, Laib A (2001). Effects of four Ni–Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography. *Int Endod J* 34 (3): 221-230.
- Pires PT, Ferreira JC, Oliveira SA, Silva MJ, Melo PR (2013). Effect of ozonegas on the shear bond strength to enamel. *J Appl Oral Sci* 21 (2): 177-182.
- Pissiotis E, Spångberg LS (1994). Dentin permeability to bacterial proteins in vitro. *J Endod* 20 (3): 118-122.
- Polydorou O, Halili A, Wittmer A, Pelz K, Hahn P (2012). The antibacterial effect of gas ozone after 2 months of in vitro evaluation. *Clin Oral Investig* 16 (2): 545-550.

- Raafat Abdelaziz R, Mosallam RS, Yousry MM (2011). Tubular occlusion of simulated hypersensitive dentin by the combined use of ozone and desensitizing agents. *Acta Odontol Scand* 69 (6): 395-400.
- Reeves R, Stanley HR (1966). The relationship of bacterial penetration and pulpal pathosis in carious teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 22 (1): 59-65.
- Resch A, Rosenstein R, Nerz C, Götz F (2005). Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. *Appl Environ Microbiol* 71 (5): 2663-2676.
- Retamozo B, Shabahang S, Johnson N, Aprecio RM, Torabinejad M. (2010). Minimum Contact Time and Concentration of Sodium Hypochlorite Required to Eliminate *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 36 (3): 520-523.
- Ricucci D, Russo J, Rutberg M, Burleson JA, Spångberg LS (2011). A prospective cohort study of endodontic treatments of 1,369 root canals: results after 5 years. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 112 (6): 825-842.
- Rôças IN, Siqueira JF Jr (2011). Comparison of the in vivo antimicrobial effectiveness of sodium hypochlorite and chlorhexidine used as root canal irrigants: a molecular microbiology study. *J Endod* 37 (2): 143-150.
- Rossi-Fedele G, Steier L, Dogramaci EJ, Canullo L, Steier G, de Figueiredo JA (2013). Bovine pulp tissue dissolution ability of HealOzone®, Aquatine Alpha Electrolyte® and sodium hypochlorite. *Aust Endod J* 39 (2): 57-61.
- Safavi K, Spångberg LSW (2006) Chlorhexidin in der Endodontie, Chemie, antimikrobielle Wirkung und mögliche Indikationen. *Endodontie* 15 (2): 171-176.
- Sakai VT, Cordeiro MM, Dong Z, Zhang Z, Zeitlin BD, Nör JE (2011). Tooth slice/scaffold model of dental pulp tissue engineering. *Adv Dent Res* 23 (3): 325-332.
- Santos J, Tjäderhane L, Ferraz C, Zaia A, Alves M, De Goes M, Carrilho M (2010). Long-term sealing ability of resin-based root canal fillings. *Int Endod J* 43 (6): 455-460.
- Schilder H (1967). Filling root canals in three dimensions. *Dent Clin North Am* 723-744.
- Schmidlin PR, Zimmermann J, Bindl A (2005). Effect of Ozone on Enamel and Dentin Bond Strength. *J Adhes Dent* 7 (1) 29-32
- Schmidt M (1988). Pioneers of ozone research: A historical survey. Kaltenburg-Lindau: Max-Planck-Institut für Aeronomie

- Seo MS, Hwang KG, Lee J, Kim H, Baek SH (2013). The effect of mineral trioxide aggregate on odontogenic differentiation in dental pulp stem cells. *J Endod* 39 (2): 242-248.
- Shuping GB, Ørstavik D, Sigurdsson A, Trope M (2000). Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. *J Endod* 26 (12): 751-755.
- Siqueira JF Jr. (2011a). Treatment of endodontic infections. Berlin: Quintessenz Verlags-GmbH, 9-16.
- Siqueira JF Jr. (2011b). Treatment of endodontic infections. Berlin: Quintessenz Verlags-GmbH, 43-62.
- Siqueira JF Jr. (2011c). Treatment of endodontic infections. Berlin: Quintessenz Verlags-GmbH, 65-92.
- Siqueira JF Jr. (2011d). Treatment of endodontic infections. Berlin: Quintessenz Verlags-GmbH, 19-39.
- Siqueira JF Jr., Alves FR, Almeida BM, de Oliveira JC, Rôças IN (2010). Ability of chemomechanical preparation with either rotary instruments or self-adjusting file to disinfect oval-shaped root canals. *J Endod* 36 (11): 1860-1865
- Siqueira JF Jr., Lima KC, Magalhaes FA, Lopes HP, de Uzeda M (1999). Mechanical reduction of the bacterial population in the root canal by three instrumentation techniques. *J Endod* 25 (5): 332-335.
- Siqueira JF Jr., Rôças IN (2009). The Microbiota of Acute Apical Abscesses. *J Dent Res* 88 (1): 61-65.
- Siqueira JF Jr, Rôças IN, Alves FR, Silva MG (2009). Bacteria in the apical root canal of teeth with primary apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 107 (5): 721-726.
- Siqueira JF Jr., Rôças IN, Paiva SS, Guimarães-Pinto T, Magalhães KM, Lima KC (2007). Bacteriologic investigation of the effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 104 (1): 122-130.
- Sirtes G, Waltimo T, Schaetzle M, Zehnder M (2005). The effects of temperature on sodium hypochlorite short-term stability, pulp dissolution capacity, and antimicrobial efficacy. *J Endod* 31 (9): 669-671.

- Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G (1997). Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 30 (5): 297-306.
- Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE (1994). "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* 17 (4): 788-792.
- Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K (2001). An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *Int Endod J* 34 (4): 300-307.
- Sritharan A (2002). Discuss that the coronal seal is more important than the apical seal for endodontic success. *Aust Endod J* 28 (3): 112-115.
- Summanen P, Jousimies-Somer H (1988). Comparative evaluation of RapID ANA and API 20 A for identification of anaerobic bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 7 (6): 771-775.
- Syed SA, Loesche WJ (1972). Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Appl Microbiol* 1972 24 (4): 638-644.
- Trope M, Debelian G (2009). Microbial control: the first stage of root canal treatment. *Gen Dent* 57 (6): 580-588.
- Trope M, Delano EO, Ørstavik D (1999). Endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: single vs. multivisit treatment. *J Endod* 25 (5): 345-350.
- Umweltbundesamt (2015). Ozon. URL: <http://www.umweltbundesamt.de/luft/schadstoffe/ozon.htm> - Download am 12.06.2015
- Unal GC, Kecici AD, Kaya BU, Tac AG (2011). Quality of root canal fillings performed by undergraduate dental students. *Eur J Dent* 5 (3): 324-330.
- van der Sluis LW, Versluis M, Wu MK, Wesselink PR (2007). Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. *Int Endod J* 40 (6): 415-426.
- Viktorov, Y (2006). Prävalenz von apikalen Parodontitiden sowie die Häufigkeit und Qualität endodontischer Behandlungen in einer Berliner Population. Dissertation im Fach Zahnmedizin, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Voß A (2004). Die Bestimmung der endodontischen Arbeitslänge. URL: http://www.dgzmk.de/uploads/tx_szdgzmkdocuments/Die_Bestimmung_der_endodontischen_Arbeitslaenge.pdf - Download 12.06.2015

- Waltimo T, Trope M, Haapasalo M, Ørstavik D (2005). Clinical efficacy of treatment procedures in endodontic infection control and one year follow-up of periapical healing. *J Endod* 31 (12): 863-866.
- Wang J, Ma H, Jin X, Hu J, Liu X, Ni L, Ma PX (2011). The effect of scaffold architecture on odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *Biomaterials* 32 (31): 7822-7830.
- Weiger R, Rosendahl R, Löst C (2000). Influence of calcium hydroxide intracanal dressings on the prognosis of teeth with endodontically induced periapical lesions. *Int Endod J* 33 (3): 219-226.
- Weltgesundheitsorganisation (2005). URL: http://extranet.who.int/iris/restricted/bitstream/10665/40919/1/9241544678_eng.pdf?ua=1 – Download 11.06.2015
- Wolf HF (2007). Farbatlanten der Zahnmedizin, Endodontologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 7-20 und 31-38.
- Wolff A (1915). Die medizinische Verwendbarkeit des Ozons. *Dtsch Med Wschr* 11: 311.
- Yang X, Yang F, Walboomers XF, Bian Z, Fan M, Jansen JA (2010). The performance of dental pulp stem cells on nanofibrous PCL/gelatin/nHA scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 93 (1): 247-257.
- Zhang W, Ahluwalia IP, Literman R, Kaplan DL, Yelick PC (2011). Human dental pulp progenitor cell behavior on aqueous and hexafluoroisopropanol based silk scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 97 (4): 414-422.

9 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Flussdiagramm Studienverlauf</i>	<i>32</i>
<i>Abbildung 2: Desinfektion der Wurzelkanäle mit NaOCl.....</i>	<i>35</i>
<i>Abbildung 3: Probenentnahme mit Papierspitze.....</i>	<i>35</i>
<i>Abbildung 4a: healOzone X4</i>	<i>36</i>
<i>Abbildung 4b: Handstück (noch nicht vollständig auf Zahn aufgesetzt) mit Endokanüle und Silikonkappe</i>	<i>36</i>
<i>Abbildung 5: Bactron II</i>	<i>38</i>
<i>Abbildung 6: Stericult 3311</i>	<i>38</i>
<i>Abbildung 7a: Beimpfen der Agarplatte</i>	<i>39</i>
<i>Abbildung 7b: Ausplattieren auf Drehtisch.....</i>	<i>39</i>
<i>Abbildung 8a: Mischkultur einer 10^3 verdünnten und ausplattierten Probe (Probe 1).....</i>	<i>39</i>
<i>Abbildung 8b: Bakterienisolierung mittels 3-Ösenausstrich.....</i>	<i>39</i>
<i>Abbildung 9: Microflex LT Tischgerät</i>	<i>40</i>
<i>Abbildung 10a: Auftragen von Bakterien auf das Target</i>	<i>41</i>
<i>Abbildung 10b: Überschichten mit 70 % Ameisensäure</i>	<i>41</i>
<i>Abbildung 10c: Überschichten mit α-Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure</i>	<i>41</i>
<i>Abbildung 10d: MALDI-TOF Massenspektrum eines Streptococcus salivarius</i>	<i>41</i>
<i>Abbildung 11: mittlere Bakterienanzahl während den unterschiedlichen Abschnitten der Wurzelkanalbehandlung in halblogarithmischer Darstellung mit Standartabweichung.....</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 12: Box-Whisker-Plot, Darstellung der Anzahl verschiedener Bakterienspezies während den unterschiedlichen Abschnitten der Wurzelkanalbehandlung</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 13: Anzahl der am häufigsten beobachteten Bakteriengenera a) in der Ozongruppe, b) in der NaOCl Gruppe</i>	<i>50</i>
<i>Abbildung 14: Diagnoseaufnahme.....</i>	<i>53</i>

<i>Abbildung 15: Röntgenmessaufnahme.....</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 16: Masterpointaufnahme</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 17: Kontrolle der Wurzelfüllung.....</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 18: 6-Monats-Recall.....</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 19: 12-Monats-Recall.....</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 20: Diagnoseaufnahme.....</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 21: Röntgenmessaufnahme.....</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 22: Masterpointaufnahme</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 23: Kontrolle der Wurzelfüllung.....</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 24: 6-Monats-Recall.....</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 25: 12-Monats-Recall.....</i>	<i>55</i>

10 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: klinische Daten des Patientenkollektives vor der Behandlung sowie nach 6 und 12 Monaten</i>	<i>46</i>
<i>Tabelle 2: röntgenologische Untersuchungsergebnisse vor Behandlungsbeginn sowie nach 6 und 12 Monaten</i>	<i>46</i>
<i>Tabelle 3: Ergebnisse der Bakterienreduktion zwischen den verschiedenen Behandlungsschritten</i>	<i>51</i>

11 Abkürzungsverzeichnis

Ca(OH) ₂	Kalziumhydroxid
CFU	koloniebildende Einheit
CHX	Chlorhexidindigluconat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	et alii, et aliae oder et alia (und andere)
FGF-2	fibroblast growth factor 2
H ₂	Wasserstoff
H ₂ O	Wasser
HOCl	Hypochlore Säure
ICD-10-GM	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision, German Modification
kDa	Kilodalton
KTP Laser	Kaliumtitanylphosphat Laser
LLLT	low level Laser Therapie
MALDI-TOF MS	matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectroscopy
N ₂	Stickstoff
Na ⁺	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
NaOCl	Natriumhypochlorit
OH ⁻	Hydroxidion
PAI	periapical index
PBS	phosphate buffered saline
pH	potentia Hydrogenii
ppm	parts per million
PUI	passive ultrasonic irrigation
RANK	receptor activator of nuclear factor kappaB
RANKL	receptor activator of nuclear factor kappaB ligand
rpm	Umdrehung pro Minute

rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
spp.	Spezies
TGF- β 1	transforming growth factor beta 1
TST	Taschensondierungstiefe
WHO	Weltgesundheitsorganisation
Z.n.	Zustand nach

12 Anhang

12.1 Verwendete Geräte im Labor

- Bactron II, Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, OR, USA
- BD GasPak™ 100-System, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
- Eppendorf Research® (variabel) 0.5-10 µl, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Eppendorf Research® (variabel) 100-1000 µl, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Eppendorf Research® (variabel) 10-100 µl, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- MALDI Biotyper System, Microflex LT Tischgerät mit flexControl 3.3 Steuersoftware, Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Deutschland
- Pipettenkarussell für 6 Pipetten, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Reaktionsgefäß-Ständer, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
- Sensorturn, WLD-TEC GmbH, Göttingen, Deutschland
- Stericult 3311, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
- Vortex Genie®2, neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland

12.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien und Chemikalien im Labor

- Acetonitrile, CHROMASOLV® Plus, für HPLC, ≥ 99,9 %, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- Aktivkohle pro analysi, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Ameisensäure, Reinheitsgrad, ≥ 95 %, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- Bacteriological agar, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- Bacto™ Tryptose, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA
- BBL™ Thiotone™ E Peptone Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA
- BD Falcon Tubes (Conical, 15 ml), Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
- BD GasPak™ EZ Anaerob-Entwickler, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland

- Calciumchlorid-Hexahydrat zur Analyse, neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
- D-(+)-Glucose Minimum 99,5 %, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- Difco™ Gelatin, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA
- Einmal-Impfösen, z. B. VWR 631-7133, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
- Einmalspatel (T-Form), z. B. VWR 612-2652, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
- epT.I.P.S.® Pipettenspitzen (0,1-20 µl, 40 mm), Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- epT.I.P.S.® Pipettenspitzen (2-200 µl, 53 mm), Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- epT.I.P.S.® Pipettenspitzen (50-1.000 µl, 71 mm), Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Ethanol absolut geeignet für die präparative Chromatographie Ph Eur, BP, USP, Merck, Darmstadt, Deutschland
- EtOH, reinst, z. B. Merck 1009800500, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Gas für Anaerobierbank, Linde AG, München, Deutschland
- Isotone Natriumchloridlösung 0,9 %, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Kaliumchlorid zur Analyse, neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
- L-Cystein, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- Magnesiumsulfat-Heptahydrat zur Analyse, neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
- Natriumchlorid $\geq 99,5$ % p.a., Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Natriumglycerophosphat-Hydrat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- Natriumthiosulfat-Pentahydrat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- Natronlauge 5 mol/l, Apotheke Innenstadt Universität München, München, Deutschland

- Phenylquecksilberacetat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- Providon-Iodlösung (Braunol, B. Braun Melsungen AG)
- Sempercure® nitrile (Untersuchungshandschuhe), Semperit Technische Produkte GmbH, Wien, Österreich
- Standard Reaktionsgefäß 3810X (1,5 ml), Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Thioglycolsäure pro analysi, Merck, Darmstadt, Deutschland
- α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure, für MALDI-TOF MS, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

12.3 Verwendete Geräte in der Patientenbehandlung

- Dentaport ZX, J. Morita Europe GmbH, Dietzenbach, Deutschland
- healOzone X4, Curozone GmbH, Wiesbaden, Deutschland
- HELIODENT DS, Sirona Dental GmbH, Wals bei Salzburg, Österreich
- VDW.SILVER® RECIPROC®, VDW GmbH, München, Deutschland

12.4 Verwendete Verbrauchsmaterialien und Chemikalien in der Patientenbehandlung

- AH Plus (Root Canal Sealer), DENTSPLY DeTray, Konstanz, Deutschland
- Ethylendiamintetraessigsäure 17 %, Apotheke Innenstadt Universität München, München, Deutschland
- Kappen (3 mm, 4 mm, 5 mm, 6 mm), Curozone GmbH, Wiesbaden, Deutschland
- Konventionelle Guttapercha (Zusatzstifte für die Masterpoint-Methode), VDW GmbH, München, Deutschland
- Mtwo® Guttapercha (Mtwo® Guttapercha passend zum Mtwo® NiTi-System), VDW GmbH, München, Deutschland
- Mtwo® Papierspitzen, VDW GmbH, München, Deutschland
- MTwo-Feilen, VDW GmbH, München, Deutschland
- Natriumhypochlorit 3 %, Apotheke Innenstadt Universität München, München, Deutschland
- Papierspitzen steril Taper .02 ISO 15, VDW GmbH, München, Deutschland
- ROEKO Wattekügelchen, Coltène/Whaledent AG, Altstätten, Schweiz

- Sempercare® premium (Untersuchungshandschuhe), Semperit Technische Produkte GmbH., Wien, Österreich
- SPEIKOSEPT CHX 2 %, SPEIKO - Dr. Speier GmbH, Münster, Deutschland
- Teststreifen für Anaerobenbank (BD 271051),
- Wasserstoffperoxid 3%, Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken

12.5 Zusammensetzung verwendeter Nährmedien und Lösungen

a) BD Columbia Agar mit 5 % Schafsblut (BD Diagnostic Systems, Heidelberg, Deutschland)

Zusammensetzung pro Liter destilliertem Wasser

Pankreatisch abgebautes Casein	12,0 g
Peptisch abgebautes Tiergewebe	5,0 g
Hefeextrakt	3,0 g
Rindfleischextrakt	3,0 g
Maisstärke	1,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
Agar	13,5 g
Defibriniertes Schafblut	5 %
pH 7,3 ± 0,2	

b) BD Schaedler Agar mit 5 % Schafsblut (BD Diagnostic Systems, Heidelberg, Deutschland)

Zusammensetzung pro Liter destilliertem Wasser

Pankreatisch abgebautes Casein	8,2 g
Peptisch abgebautes Tiergewebe	2,5 g
Papainisch abgebautes Sojamehl	1,0 g
Glucose	5,8 g
Hefeextrakt	5,0 g
Natriumchlorid	1,7 g
Dikaliumphosphat	0,8 g
L-Cystin	0,4 g
Hämin	0,01 g
Vitamin K 1	0,01 g
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	3,0 g

Agar	13,5 g
Schafblut, defibriniert	5 %
pH 7,6 ± 0,2	

c) VMG-I (Möller 1966)

Bacto-Gelatin	10 g
Tryptose	5 g
Thiotone	5 g
Cystein Hydrochlorit	0,5 g
Thioglycolsäure (99 %)	0,5 ml
destilliertes Wasser	900 ml
Stammlösung I	100 ml

Alle Zutaten in destiliertem Wasser lösen und dann die Stammlösung zufügen. Den pH-Wert mit 1molarer Natronlauge auf 7,4 einstellen. Medium Autoklavieren bei 121 °C für 20 min. Lagerung bei Raumtemperatur.

d) Stammlösung-I (Möller 1966)

- Calciumchlorid-Hexahydrat zur Analyse	2,4 g
- Kaliumchlorid zur Analyse	4,2 g
- Natriumchlorid	10 g
- Magnesiumsulfat-Heptahydrat zur Analyse	1 g
- Natriumglycerolphosphat	100 g
- destilliertes Wasser	auf 1000 ml auffüllen

Die Salze in über 800 ml destilliertes Wasser lösen und dann auf 1000 ml auffüllen. Lagerung bei 5 °C.

e) VMG-II (Möller 1966)

- Agar, gewaschen	0,1 g
- destilliertes Wasser	900 ml
- Bacto-Gelatin	10 g
- Tryptose	0,5 g
- Thiotone	0,5 g
- Cystein Hydrochlorit	0,5 g
- Thioglycolsäure (99 %)	0,5 ml

- Aktivkohle 10 g
- Stammlösung II 100 ml

Agar durch Erhitzen in destilliertem Wasser auflösen, nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C Zugabe der restlichen Zutaten. Den pH-Wert mit 1 molarer Natronlauge auf 7,5 einstellen. Medium Autoklavieren bei 121 °C für 20 min. Lagerung bei Raumtemperatur.

f) Stammlösung-II (Möller 1966)

- Phenylquecksilberacetat 0,03 g
- Calciumchlorid-Hexahydrat zur Analyse 2,4 g
- Kaliumchlorid zur Analyse 4,2 g
- Natriumchlorid 10 g
- Magnesiumsulfat-Heptahydrat zur Analyse 1 g
- Natriumglycerolphosphat 100 g
- destilliertes Wasser auf 1000 ml auffüllen

Das Phenylquecksilberacetat durch schonendes Erwärmen in über 800 ml destilliertem Wasser lösen, die anderen Salze hinzufügen und dann auf 1000ml auffüllen. Lagerung bei 5 °C.

g) 5 %-Natriumthiosulfatlösung

- Natriumthiosulfat 50 g
- destilliertes Wasser auf 1000 ml auffüllen

12.6 Votum Ethikkommission



Klinikum der Universität München · Ethikkommission · Pettenkoferstr. 8 · 80336 München

Frau
PD Dr. K. C. Huth
Klinikum der LMU München
Poliklinik für Zahnerhaltung und
Parodontologie
St. Anna Str. 15
86938 Schondorf

Vorsitzender:
Prof. Dr. W. Eisenmenger
Telefon +49 (0)89 5160 - 5191
Telefax +49 (0)89 5160 - 5192
Ethikkommission@
med.uni-muenchen.de

www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de

Postanschrift:
Pettenkoferstr. 8a
80336 München

Hausanschrift:
Pettenkoferstr. 8
80336 München
München, 02.03.2011 Hb/ cp

Melde-Nr.	00006376
Titel	Antimikrobielle Wirkung von Ozon bei apikaler Parodontitis
PrüfplanCode	-
Sponsor	Klinikum der LMU München
Prüfer	PD Dr. K. C. Huth (HP), L. Schelcht, Dr. Y. Malik, S. Lenzke
Projekt	018-11

Sehr geehrte Frau Kollegin Huth,

besten Dank für Ihr Schreiben vom 24.02.2011 mit der Beantwortung unserer Fragen bzw. Erfüllung der Auflagen und den noch ausstehenden bzw. überarbeiteten Unterlagen (Zustimmung des Klinikdirektors, Patienteninformation und Einwilligungserklärung).

Die Ethikkommission (EK) kann Ihrer Studie nun die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit zuerkennen.

Vorsorglich möchte ich darauf hinweisen, dass auch bei einer positiven Beurteilung des Vorhabens durch die EK die ärztliche und juristische Verantwortung für die Durchführung des Projektes uneingeschränkt bei Ihnen und Ihren Mitarbeitern verbleibt. Sie werden gebeten, die EK über alle schwerwiegenden oder unerwarteten Ereignisse im Rahmen der Studie zu unterrichten. Änderungen des Studienprotokolls sind der EK mitzuteilen.

Für Ihre Studie wünsche ich Ihnen viel Erfolg.

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. W. Eisenmenger
Vorsitzender der Ethikkommission

Dr. Beate Henrikus
Geschäftsstelle

N/ Mitglieder der Ethikkommission

P.S.: Bitte beachten Sie die aktuellen Richtlinien /Erläuterungen zum Antragsformular:

www.ethikkommission.med.uni-muenchen

Mitglieder der Kommission:

Prof. Dr. W. Eisenmenger (Vorsitzender), Prof. Dr. E. Held (stellv. Vorsitzender), Prof. Dr. G. Paumgartner (stellv. Vorsitzender), PD Dr. Th. Beinert, Prof. Dr. H. U. Gallwas, Prof. Dr. D. Kunze, Dr. V. Mönch, Prof. Dr. R. Penning, Prof. Dr. K. Hahn, Prof. Dr. K. Pfeifer, Dr. Ch. Zach

12.7 Patienteninformation und Einwilligungserklärung

Klinikum der Universität München

Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie

Innenstadt

Direktor: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Klinikum der Universität München □ Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie,
Goethestraße 70 □ D-80336 München



PD Dr. K.C. Huth (München): Tel.: 089/ 5160-941

Dr. S. Hecker (Regensburg): Tel.: 0941-944-6018



Patienteninformation und Einwilligungserklärung

Studientitel:

„Antimikrobielle Wirkung von Ozon bei apikaler Parodontitis“

Liebe Patientin, lieber Patient!

Bei Ihnen wurde an einem Zahn eine behandlungsbedürftige apikale Parodontitis (Entzündung des Gewebes um die Zahnwurzelspitze) diagnostiziert. Diese Entzündung wird hauptsächlich von Bakterien verursacht. Die größte Herausforderung der zur Behandlung notwendigen Wurzelkanalbehandlung ist die vollständige Desinfektion des Kanalsystems mit verschiedenen Mitteln. Ein neuer Ansatz zur Wurzelkanaldesinfektion ist der Einsatz von Ozongas. Diese Substanz hat bereits in Studien eine gleichwertige Desinfektionswirkung wie das Standarddesinfektionsmittel (Natriumhypochlorit) gezeigt. In dieser Studie soll die antimikrobielle Wirkung von Ozongas im Rahmen einer Wurzelkanalbehandlung getestet werden. Dazu wird nach jedem Behandlungsschritt die Papierspitze, die in jeder Standardbehandlung zur Trocknung des Kanals eingesetzt wird, nicht wie üblich verworfen, sondern einer bakteriologischen Untersuchung zugeführt. Insgesamt handelt es sich dabei um 5 Papierspitzen pro behandeltem Zahn. Nach 6 und 12 Monaten erfolgt wie bei der Standardbehandlung auch eine erneute klinische und radiologische Untersuchung, um den Behandlungserfolg zu bewerten. Es werden im Rahmen dieser Studie keine zusätzlichen Röntgenbilder angefertigt. Beim Einsatz von Ozongas statt dem üblichen Natriumhypochlorit ist ebenso nicht mit zusätzlichen Schmerzen zu rechnen.

Nutzen/Risiko für den Patienten:

Der Nutzen einer Verwendung von Ozongas im Wurzelkanal liegt in der stark desinfizierenden Wirkung. Die möglichst gute Reduktion bzw. Abtötung der Keime im Wurzelkanal bedingt zu einem großen Anteil den Erfolg der Behandlung einer apikalen Parodontitis. Die Standardbehandlung führt nicht immer zum Erfolg. Dies könnte mit dem Einsatz von Ozongas verbessert werden. Daher könnten Sie selbst sowie auch nachfolgende Patienten von dem Einsatz von Ozongas im Wurzelkanal profitieren.

Aus zahnärztlicher Sicht besteht kein erhöhtes Behandlungsrisiko beim Einsatz von Ozongas im Wurzelkanal. Das Gas wird nur dann in den Kanal abgegeben, wenn ein dichter Abschluss

am Kanaleingang über eine Silikonkappe erreicht wurde. Damit wird eine Inhalation von Ozongas durch Sie und auch das Behandlungsteam vermieden.

Die Ergebnisse der zahnärztlichen sowie der mikrobiologischen Untersuchung, unterliegen der ärztlichen Schweigepflicht und werden vertraulich behandelt. Eine Weitergabe der gespeicherten erhobenen persönlichen Daten und Befunde erfolgt ausschließlich in verschlüsselter Form, wobei keine personenbezogenen Elemente wie Initialen oder Geburtsdaten erscheinen. Dies gilt auch für etwaige Veröffentlichungen dieser Untersuchung. Eine Entschlüsselung der Daten würde nur in dem unwahrscheinlichen Falle erfolgen, wenn die Bakterienlast im Wurzelkanal am Ende der Behandlung überdurchschnittlich hoch wäre. Dann wäre ein zusätzlicher Desinfektionsschritt von Nutzen für den Patienten. Der Zugang zu den Originaldaten und zum Verschlüsselungscode ist auf die folgenden Zahnärzte beschränkt: Standort München: OÄ PD Dr. K.C. Huth, Dr. L. Schlecht, Dr. Y. Malyk, Dr. S. Lenzke; Standort Regensburg: Dr. S. Hecker, Dr. S. Wiesbauer. Diese Personen unterliegen der Schweigepflicht und sind zur Beachtung des Datenschutzes verpflichtet. Im Falle Ihres Widerrufs der Einwilligung werden die bis dahin erhobenen verschlüsselten Daten in irreversibel anonymisierter Form weiter verwendet.

Es wurde keine Wege-Unfall-Versicherung und keine verschuldensunabhängige Versicherung abgeschlossen.

Ich wurde vollständig über die Bedeutung und Tragweite der Untersuchung aufgeklärt. Ich habe den Aufklärungstext gelesen und verstanden. Ich hatte die Möglichkeit, Fragen zu stellen und habe die Antworten verstanden und akzeptiere sie.

Ich weiß, dass die Teilnahme an dieser Studie freiwillig ist und dass ich jederzeit ohne Angabe von Gründen diese Zustimmung widerrufen kann, ohne dass sich dieser Entschluss nachteilig auf die spätere Behandlung durch meinen Arzt auswirken wird.

Hiermit willige ich in die Teilnahme an der beschriebenen Studie ein.

Ich bin mit der Erhebung und Verwendung persönlicher Daten und Befunddaten nach Maßgabe der Patienteninformation einverstanden.

München/Regensburg (nicht zutreffendes streichen!), den

Aufklärender Arzt:

Patient:.....

12.8 Untersuchungsbögen

Klinikum der Universität München

Poliklinik für Zahnerhaltung und

Parodontologie Innenstadt

Direktor: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Klinikum der Universität München ☐ Poliklinik für Zahnerhaltung und
Parodontologie, Goethestraße 70 ☐ D-80336 München



PD Dr. K.C. Huth (München): Tel.: 089/ 5160-9411

Dr. S. Hecker (Regensburg): Tel.: 0941-944-6018

Titel der Studie: ***Klinische Studie zur antimikrobiellen Wirkung von Ozon bei apikaler Parodontitis***

Dokumentationsbogen Baseline

Codeaufkleber:

Zahn: _____; Behandler: _____

Trepanation, Aufbereitung: Datum _____

Endgültige Wurzelfüllung: Datum _____

Patientengruppe: ☐ NaOCl

☐ O₃-Gas

Klinische Untersuchung vor Eröffnung des Zahnes

Subjektiv

Schmerzen: ☐ ja ☐ nein

Perkussion: ☐ ja ☐ nein

Ap. Druckschmerz: ☐ ja ☐ nein

Objektiv

Schwellung: ☐ ja ☐ nein

Fistel: ☐ ja ☐ nein

Abszess: ☐ ja ☐ nein

Klinischer Zustand des Zahnes:

Offene Kavität im Dentin (mit oder ohne Füllungsresten) ohne Pulpaexposition ☐

Offene Kavität (mit oder ohne Füllungsresten) mit Pulpaexposition ☐

Intakte Füllung ☐

Nicht intakte Füllung (Randspalt, Fraktur, Sekundärkaries, sonstiges: _____) ☐

Zustand nach Trauma ☐

Abrasion/Attrition ☐

Sonstiges: _____ ☐

Lockerungsgrad: ☐0 ☐ I ☐ II ☐ III

6-Punkt TST in mm (zu behandelnder Zahn, mesialer und distaler Nachbarzahn)

<i>Zahn</i>	<i>vest. distal</i>	<i>vestibulär</i>	<i>vest. mesial</i>	<i>oral mesial</i>	<i>oral</i>	<i>oral distal</i>

Radiologische Beurteilung der apikalen Entzündung vor Eröffnen des Zahnes

Größter Durchmesser der periapikalen Radioluzenz (Genauigkeit: 0,5 mm):

☐ < 2mm ☐ 2 mm – 5 mm ☐ > 5 mm

PAI-Index (nach Orstavik)

- ☐ 1 (Normalbefund)
- ☐ 2 (geringgradige Veränderung der Knochenstruktur)
- ☐ 3 (Knochenstrukturveränderungen mit geringer Dichteverminderung)
- ☐ 4 (gut abgegrenzte periapikale Osteolyse)
- ☐ 5 (Schwere apicale Parodontitis mit Zeichen der Exazerbation)

Röntgenologische Beurteilung der Wurzelkanalfüllung:

Länge:

- ☐ Akzeptabel: Wurzelfüllung befindet sich innerhalb des Kanalsystems und höchstens 2 mm koronal des röntgenologischen Apex.
- ☐ Unterfüllt: >2 mm zu kurz bzgl. des röntgenologischen Apex.
- ☐ Überfüllt: Füllmaterial über den röntgenologischen Apex hinaus gepresst.

Dichte:

- ☐ Homogen, ideal
- ☐ Homogen, klinisch akzeptabel
- ☐ Nicht homogen, klinisch nicht akzeptabel.

Evaluation des Behandlungscomforts für den Zahnarzt in Abhängigkeit der Methode

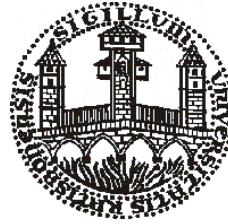
- ☐ Einfach
- ☐ Zeitaufwändig
- ☐ Abdichtung mit der Silikonkappe bei Ozongasapplikation schwierig zu erzielen.

Klinikum der Universität München

Poliklinik für Zahnerhaltung und

Parodontologie Innenstadt

Direktor: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel



Klinikum der Universität München ☐ Poliklinik für Zahnerhaltung und
Parodontologie, Goethestraße 70 ☐ D-80336 München

PD Dr. K.C. Huth (München): Tel.: 089/ 5160-9411

Dr. S. Hecker (Regensburg): Tel.: 0941-944-6018

Titel der Studie: ***Klinische Studie zur antimikrobiellen Wirkung von Ozon bei apikaler Parodontitis***

Dokumentationsbogen 6 Monate nach Behandlung

Codeaufkleber:

Zahn: _____; Behandler: _____

Trepanation, Aufbereitung: Datum _____

Endgültige Wurzelfüllung: Datum _____

Follow-up nach 6 Monaten: Datum _____

Klinische Untersuchung

Subjektiv

Schmerzen: ☐ ja ☐ nein

Perkussion: ☐ ja ☐ nein

Ap. Druckschmerz: ☐ ja ☐ nein

Objektiv

Schwellung: ☐ ja ☐ nein

Fistel: ☐ ja ☐ nein

Abszess: ☐ ja ☐ nein

Klinischer Zustand des Zahnes:

Offene Kavität im Dentin (mit oder ohne Füllungsresten) ohne Pulpaexposition ☐

Offene Kavität (mit oder ohne Füllungsresten) mit Pulpaexposition ☐

Intakte Füllung ☐

Nicht intakte Füllung (Randspalt, Fraktur, Sekundärkaries, sonstiges: _____) ☐

Zustand nach Trauma ☐

Abrasion/Attrition ☐

Sonstiges: _____ ☐

Lockerungsgrad: ☐ 0 ☐ I ☐ II ☐ III

Taschentiefen in mm (zu behandelnder Zahn + mesialer und distaler Nachbarzahn)

Zahn	vest. distal	vestibulär	vest. mesial	oral mesial	oral	oral distal

Radiologische Beurteilung der apikalen Entzündung nach 6 Monaten

Größter Durchmesser der periapikalen Radioluzenz (Genauigkeit: 0,5 mm):

☐ < 2mm ☐ 2 mm – 5 mm ☐ > 5 mm

PAI-Index (nach Orstavik)

- ☐ 1 (Normalbefund)
- ☐ 2 (geringgradige Veränderung der Knochenstruktur)
- ☐ 3 (Knochenstrukturveränderungen mit geringer Dichteverminderung)
- ☐ 4 (gut abgegrenzte periapikale Osteolyse)
- ☐ 5 (Schwere apicale Parodontitis mit Zeichen der Exazerbation)

Behandlungserfolg

- ☐ A Erfolg/vollständige Heilung: Parodontalspalt in Form und Größe normal oder leichte radioluzente Zone um überpresstes Material herum, klinisch symptomfrei;
- ☐ B unvollständige Heilung: deutliche kleinere Aufhellung, klinisch symptomfrei, kein weiteres Follow-up verfügbar;
- ☐ C Misserfolg/keine Heilung: unveränderter Zustand, größere oder neue Aufhellung mit klinischen Symptomen einer periapikalen Parodontitis.

Geplantes weiteres Vorgehen

- ☐ keine weiteren Interventionen nötig, Kontrolle nach 6 Monaten
- ☐ Revision der Wurzelfüllung

Grund für Revision: _____

- ☐ Extraktion

Grund für Extraktion: _____

Klinikum der Universität München

Poliklinik für Zahnerhaltung und

Parodontologie Innenstadt

Direktor: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel



Klinikum der Universität München ☐ Poliklinik für Zahnerhaltung und
Parodontologie, Goethestraße 70 ☐ D-80336 München

PD Dr. K.C. Huth (München): Tel.: 089/ 5160-9411

Dr. S. Hecker (Regensburg): Tel.: 0941-944-6018

Titel der Studie: ***Klinische Studie zur antimikrobiellen Wirkung von Ozon bei apikaler Parodontitis***

Dokumentationsbogen 12 Monate nach Behandlung

Codeaufkleber:

Zahn: _____; Behandler: _____

Trepanation, Aufbereitung: Datum _____

Endgültige Wurzelfüllung: Datum _____

Follow-up nach 6 Monaten: Datum _____

Follow-up nach 12 Monaten: Datum _____

Klinische Untersuchung

Subjektiv

Schmerzen: ☐ ja ☐ nein

Perkussion: ☐ ja ☐ nein

Ap. Druckschmerz: ☐ ja ☐ nein

Objektiv

Schwellung: ☐ ja ☐ nein

Fistel: ☐ ja ☐ nein

Abszess: ☐ ja ☐ nein

Klinischer Zustand des Zahnes:

Offene Kavität im Dentin (mit oder ohne Füllungsresten) ohne Pulpaexposition ☐

Offene Kavität (mit oder ohne Füllungsresten) mit Pulpaexposition ☐

Intakte Füllung ☐

Nicht intakte Füllung (Randspalt, Fraktur, Sekundärkaries, sonstiges: _____) ☐

Zustand nach Trauma ☐

Abrasion/Attrition ☐

Sonstiges: _____ ☐

Lockerungsgrad: ☐ 0 ☐ I ☐ II ☐ III

Taschentiefen in mm (zu behandelnder Zahn + mesialer und distaler Nachbarzahn)

Zahn	vest. distal	vestibulär	vest. mesial	oral mesial	oral	oral distal

Radiologische Beurteilung der apikalen Entzündung nach 12 Monaten

Größter Durchmesser der periapikalen Radioluzenz (Genauigkeit: 0,5 mm):

☐ < 2mm ☐ 2 mm – 5 mm ☐ > 5 mm

PAI-Index (nach Orstavik)

- ☐ 1 (Normalbefund)
- ☐ 2 (geringgradige Veränderung der Knochenstruktur)
- ☐ 3 (Knochenstrukturveränderungen mit geringer Dichteverminderung)
- ☐ 4 (gut abgegrenzte periapikale Osteolyse)
- ☐ 5 (Schwere apicale Parodontitis mit Zeichen der Exazerbation)

Behandlungserfolg

- ☐ A Erfolg/vollständige Heilung: Parodontalspalt in Form und Größe normal oder leichte radioluzente Zone um überpresstes Material herum, klinisch symptomfrei;
- ☐ B unvollständige Heilung: deutliche kleinere Aufhellung, klinisch symptomfrei, kein weiteres Follow-up verfügbar;
- ☐ C Misserfolg/keine Heilung: unveränderter Zustand, größere oder neue Aufhellung mit klinischen Symptomen einer periapikalen Parodontitis.

Geplantes weiteres Vorgehen

☐ keine weiteren Interventionen nötig, Kontrolle nach 6 Monaten

☐ Revision der Wurzelfüllung

Grund für Revision: _____

☐ Extraktion

Grund für Extraktion: _____

13 Danksagung

Besonderer Dank gebührt meiner Doktormutter Frau Prof. Karin Christine Huth für die Überlassung des anspruchsvollen und spannenden Themas. Sie stand immer mit Rat und Tat zur Seite und hat mich bei der Erstellung der Arbeit unterstützt. Vielen Dank dafür und für die angenehme und produktive Zusammenarbeit die ganze Zeit über!

Bei Herrn Prof. Reinhard Hickel möchte ich mich bedanken, das ich meine Doktorarbeit in seinem Hause durchführen durfte.

Außerdem möchte ich mich bei meinem Kollegen Herrn Dr. Maximilian Kollmuß recht herzlich bedanken, der mir immer als kompetenter Ansprechpartner zur Verfügung stand und mich bei der Patientenakquisition sowie im Labor unterstützte.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Herrn Prof. Sören Schubert, leitender Oberarzt für Klinische Mikrobiologie am Max-von-Pettenkofer Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München und seinen Mitarbeiterinnen Frau Dr. Jette Jung und Frau Christina Wagner für die sehr angenehme produktive Zusammenarbeit. Ohne sie wäre eine Analyse der Bakterien mittels MALDI-TOF MS nicht möglich gewesen.

Weiter möchte ich mich bei meinen Kollegen Frau Dr. Lisa Marie Schlecht, Dr. Yuriy Malyk und Dr. Christina Fotiadou bedanken, welche bei der Patientenakquisition mitgeholfen haben.

Für die finanzielle Unterstützung zur Durchführung der Studie möchte ich der European Society of Endodontology recht herzlich danken, welche uns im Rahmen des „Annual Research Grant“ förderten.

Eidesstattliche Versicherung

Kist, Stefan Michael

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Untersuchung der klinischen und röntgenologischen Erfolgsrate sowie der antimikrobiellen Wirkung von Ozongas bei apikaler Parodontitis im Vergleich zu einem Standarddesinfektionsprotokoll – eine randomisierte, kontrollierte, klinische Studie

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 06.10.2015

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand